



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C07K 14/47, C12N 15/12, 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, A61P 25/28, 25/18, 25/08, 37/00, C12N 15/63 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 15/12, C12R 1:91)</p>	A1	<p>(11) 国際公開番号 WO00/31132</p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月2日 (02.06.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06487</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月19日 (19.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/332484 1998年11月24日 (24.11.98) JP 特願平11/248442 1999年9月2日 (02.09.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 市村通朗 (ICHIMURA, Michio)[JP/JP] 廣瀬 了 (HIROSE, Ryo)[JP/JP] 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka, (JP) 善岡克次 (YOSHIOKA, Katsuji)[JP/JP] 〒920-0944 石川県金沢市三口新町1-5-1 Ishikawa, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。</p>
<p>(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE</p> <p>(54) 発明の名称 新規ポリペプチド</p> <p>(57) Abstract Object: to provide diagnostics, preventives and remedies for diseases in association with JNK3 cascade. Means for solution: a novel polypeptide JSAP capable of binding to JNK3; a process for producing this polypeptide; a DNA encoding this polypeptide; a recombinant vector obtained by integrating this DNA; a transformant carrying this recombinant vector; an antibody recognizing the above polypeptide; a method for quantitating the above polypeptide and an immunological staining method with the use of the above antibody; a screening method with the use of the polypeptide; and diagnostics, preventives and remedies for diseases in association with JNK3 cascade with the use of the polypeptide, DNA or antibody as described above.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

新規ポリペプチド

技術分野

本発明は、c-Jun N-terminal kinase (JNK) のアイソザイムの一つである JNK3 に結合する新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ポリペプチドの製造方法に関する。

また、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を産生する微生物、動物細胞又は動物、該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらを発現した微生物もしくは動物細胞等を利用した JNK3 シグナル伝達の阻害活性を有する化合物を探索する方法および細胞を利用した該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

背景技術

細胞内情報伝達分子として重要な役割を果たしている mitogen-activated protein kinase (MAPK) によるカスケードは酵母からヒトに至るまで、真核生物に普遍的に存在する細胞内シグナル伝達経路である。

脊椎動物では、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38、JNK/SAPK (c-Jun amino-terminal kinase/stress-activated protein kinase) の3種類の MAPK、およびそれらの活性化因子が多数同定され、機能的に異なるさまざまな MAPK 経路の存在が明らかになってきた。

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1)、epidermal growth factor (EGF)、endotoxic lipopolysaccharide (LPS)、heat shock、ultraviolet light (UV)、X-ray 等の細胞外の種々のストレス要因により、MAPK のうち JNK が活性化され、該活性化によりアポトーシス (細胞死)

が誘発されると考えられている [Science, 270, 1326 (1995)]。

即ち、ストレスにさらされた細胞において、該ストレスシグナルがsmall G-protein (R h o、R a s等) に伝わることにより、MAPK kinase kinase (MAP K K K) の一つであるME K K 1 (MAP K kinase kinase 1) が活性化され、MAP K kinase (MAP K K) の一つであるSE K 1 (もしくはMK K 4とも呼ばれる。) をリン酸化し、SE K 1を活性化する。該活性化されたSE K 1がJ N K (MAP K) をリン酸化し、J N Kが活性化される。活性化されたJ N Kが細胞の核内の転写因子の一つであるc - J u nをリン酸化し、AP-1、activating transcription factor 2 (A T F 2) 等の関与の元に、リン酸化されたc - J u nの転写活性が亢進され、アポトーシスが誘発されると推定されている。しかしながら、この核内のアポトーシスへの過程に関しては、ほとんど不明である。

神経細胞であるP C 1 2細胞を、神経細胞のタンパク性栄養因子であるnerve growth factor (N G F) 含有培地で培養し、N G Fを除いてさらに培養を続けるとアポトーシスが誘発される。該アポトーシスの誘発においてJ N K活性の上昇が認められることが報告されている [Science, 270, 1326 (1995)]。

3種類のJ N K (J N K 1、J N K 2、J N K 3) のうち、J N K 3は脳で特に高い発現を示すことが知られている [EMBO J., 15, 2760 (1996)]。

J N K 3分子のノックアウトマウスは、興奮性アミノ酸レセプターアゴニストであるカイニン酸による発作に対する耐性が確認され、野生型のマウスで見られたカイニン酸による海馬C A 3領域でのアポトーシスが見られなかった [Nature, 389, 865 (1997)]。このことより、J N K 3分子のノックアウトによる神経保護作用は、J N K 3経路の消失によるものと考えられている。

神経変性疾患において、アポトーシスによる神経細胞死が報告されている。即ち、アルツハイマー病患者の脳の海馬において、アポトーシスを起こして死滅した神経細胞が多く見られる [Experimental Neurology, 133, 225 (1995)]、アルツハイマー病患者の脳において、DNAの断片化や、アポトーシス特有の核の変

化が観察されている [Neuroreport, 5, 2529 (1994)、Neuroreport, 6, 1053 (1995)]、パーキンソン病において、黒質神経細胞のアポトーシスが観察されている [J. Neurol. Sci., 137, 120 (1996)] 等の報告がある。

JNK 3 が脳において高い発現を示すのに対し、JNK 1 および JNK 2 に関しては、ほとんどの組織で発現している。JNK 1 および JNK 2 のリン酸化基質としては、c-Jun タンパク質、ATF 2、Elk-1 (遺伝子発現を制御する転写因子の一つ) が考えられている [Nature, 389, 865 (1997)]。

JNK 3 は上記リン酸化基質に結合はするが、JNK 1、JNK 2 に比較すると、結合は弱い [EMBO J., 15, 2760 (1996)] ため、これらが真の哺乳動物におけるリン酸化基質であるかどうかについては不明である。

JNK 3 のリン酸化酵素活性は基質として c-Jun タンパク質を用いて見ることはできず、JNK 3 と相互作用すると考えられる、哺乳動物における結合タンパク質についてもほとんど報告がなかったため、JNK 3 と相互作用し、JNK 3 の機能を調節しているタンパク質を用いた生化学反応はほとんど調べられていない。

上記リン酸化基質以外に JNK 3 と結合するとされるポリペプチドとして、最近 JNK/SAPK-associated protein (JSAP1a) が報告された [1997 年日本分子生物学会 (12月)]。

JSAP1a は、後述するように JNK 3 経路のスキヤフォールド (scaffold) タンパク質として機能していることが推定されている。スキヤフォールドタンパク質としては、JNK 1 および JNK 2 を結合する、JIP-1 (JNK interacting protein-1) が知られている [Science, 281, 1671 (1998)]。また、JIP-1 の 557 番目のアミノ酸残基の後に 47 アミノ酸が挿入された配列を有するバリエーション JIP-1b も知られている。JIP-1 および JIP-1b をコードする cDNA 配列は GenBank data base に登録されている (accession number はそれぞれ AF003115、AF054611)。

更に、酵母 Saccharomyces cerevisiae の接合フェロモンのシグナル伝達経路において、STE5タンパク質がスキャフォールドタンパク質として機能していることが知られている。

即ち、STE5タンパク質は、フェロモンがそのレセプターに結合したシグナルを伝達する一連のMAP-kinase経路にある、STE11 (MAPKKK)、STE7 (MAPKK) およびFUS/KSS1 (MAPK) のすべてのkinaseと結合し、そのシグナルを効率よく伝達する機能を有するスキャフォールドタンパク質である [Genes Dev, 8, 313 (1994)、Cell, 78, 499 (1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 7762 (1994)]。

発明の開示

本発明は、ストレスやアポトーシスを誘導するシグナルに応答して活性化されるJNK3カスケード上のJNK3に結合する新規ポリペプチド、該新規ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドを認識する抗体などを利用し、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬、治療薬を提供することを目的とする。

細胞のアポトーシスを起こすメカニズムの一つとしては、JNKカスケードの活性化が考えられる。一方、アルツハイマー病、あるいはパーキンソン病などの神経変性疾患においては、その細胞死のメカニズムとしてアポトーシスがあげられる。

したがって、脳で特に高い発現をしているJNK3経路を阻害、遮断することができれば、これら神経変性疾患の治療薬となり得、JNK3経路を選択的に阻害、遮断できる薬剤は副作用の少ない治療薬としての可能性を有しているとの考えの基に鋭意検討を行い、本発明を完成するに至った。

(4) 配列番号 2 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の塩基配列から選ばれる塩基配列からなる DNA。

(5) 配列番号 6 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ JNK 3 と結合することのできるポリペプチドをコードする DNA。

上記の「ストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ JNK 3 と結合することのできるポリペプチドをコードする DNA」とは、上記 (3) または (4) 記載の DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザン・プロット・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7 ~ 1.0 M の NaCl 存在下、65℃ でハイブリダイゼーションを行った後、0.1 ~ 2 倍濃度の SSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65℃ 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー クローニング 第 2 版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] や FAST [Methods in Enzymology, 183, 63-69] 等を用いて計算したときに、配列番号 1 ~ 8 で表される塩基配列と少なくとも 80% 以上の相同性を有する DNA、好ましくは 95% 以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

(6) 上記 (3) ~ (5) のいずれか 1 つに記載の DNA をベクターに組み込

即ち、本発明は以下の(1)～(39)の発明に関する。

(1) 配列番号10～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号14～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチド。

上記において、欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、1個から数十個、特に1個から数個のアミノ酸であることが好ましい。また、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドがもとのポリペプチドと同様にJNK3と結合することができるためには、もとのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。以下、本明細書において記載された、欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドは同様の定義に基づくポリペプチドを意味する。

アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、具体的には、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー クローニング 第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて行うことができる。

(3) 上記(1)または(2)記載のポリペプチドをコードするDNA。

テル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン

(phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、上記(13)のオリゴヌクレオチド。

(15) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)または(2)のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

(16) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)または(2)のポリペプチドの発現を抑制する方法。

(17) 上記(1)または(2)のポリペプチドを認識する抗体。

(18) 上記(17)の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)または(2)のポリペプチドの免疫学的検出法。

(19) 上記(17)の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)または(2)のポリペプチドの免疫組織染色法。

(20) 上記(17)の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

(21) 配列番号9~16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号9~16のいずれか1つに記載

載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチド、JNK3および被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドとJNK3との結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

(22) 配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチド、活性化されたJNK3および被験試料とを接触させることを特徴とする、活性化されたJNK3による、該ポリペプチドのリン酸化を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

(23) 上記(21)または(22)の方法により得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

本明細書において、化合物の薬理学的に許容される塩は、薬理学的に許容される酸付加塩、金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩などを包含する。

(24) 配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(25) 遺伝子の発現を変動を上記(15)の方法を用い検出することを特徴とする、上記(24)のスクリーニング方法。

(26) ポリペプチドを上記(18)の方法を用い、検出することを特徴とする、上記(24)のスクリーニング方法。

(27) 上記(24)～(26)のいずれか1つに記載の方法により得られる化合物またはその薬理的に許容される塩。

(28) 配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチドとJNK3との結合阻害剤。

(29) 活性化されたJNK3による、配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号9～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつJNK3と結合することのできるポリペプチドのリン酸化阻害剤。

(30) 上記(1)または(2)のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

(31) 上記(1)または(2)のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

(32) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

(33) 上記(13)または(14)のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

(34) 上記(17)の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

(35) 上記(17)の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

(36) 上記(1)または(2)のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(37) 上記(36)のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

(38) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、上記(37)のスクリーニング方法。

(39) 上記(37)または(38)の方法により得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 本発明のDNAの取得およびオリゴヌクレオチドの調製

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNAあるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学, 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

全RNAからポリ (A) + RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー クローニング 第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

適切な細胞または組織として、動物の脳細胞または脳組織をあげることができる。

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やカレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and

ンタル社、ヘルス サイエンス リサーチ リソース バンク (Health Science Research Resources Bank, Japan) 等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器 cDNAライブラリーをあげることができる。

(2) 本発明のDNAの取得

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNAを有するcDNAクローンを、以下の酵母を用いたツー ハイブリッド システム(two-hybrid system)により取得することができる。

JNK3をコードする全長cDNA、例えば、マウスJNK3 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] を、GAL4 DNA結合ドメインをコードする配列を含むクローニングベクター、例えば、pAS2-1 (クローンテック社製)の該配列下に組み込み、酵母CG-1945株 (クローンテック社製)に導入する。

上記(1)の方法で、GAL4 転写活性化ドメインをコードする配列を含むクローニングベクター、例えば、pGAD10 (クローンテック社製)の該配列下に、脳由来のcDNAを挿入し、cDNAライブラリーを作製する。

該cDNAライブラリーを、上記JNK3を含有するCG-1945株に導入し、形質転換株を取得する。

CG-1945株は、GAL4 応答配列の制御下にあるHIS3およびlacZ遺伝子を持つレポーター酵母株であり、JNK3および脳cDNAのハイブリッドコンストラクトから発現される2つのタンパク質が結合する時にのみHIS3およびlacZ遺伝子が発現する。従って、得られた形質転換株より、ヒスチジン要求性が解除され (ヒスチジンを含有しない培地で生育してくる) かつβ-ガラクトシダーゼ活性を有する株を選択することにより、JNK3と結合することのできるポリペプチド (JSAP: c-Jun N-terminal kinase / stress-activated protein kinase-associated protein) をコードする本発明のDNAを有するcDNAクローンを選択することができる。

ヒスチジン要求性が解除されかつβ-ガラクトシダーゼ活性を有する形質転換

株を一度の行程で取得してもよいが、ヒスチジン要求性が解除された形質転換株あるいは形質転換株 β -ガラクトシダーゼ活性を有する形質転換株（一次ポジティブクローン）をまず選択し、次にヒスチジン要求性が解除されかつ β -ガラクトシダーゼ活性を有する形質転換株（二次ポジティブクローン）を選択し、目的とする形質転換株を取得してもよい。

上記のようにして取得された目的とする形質転換株より、常法に準じて p G A D 由来のプラスミドを回収し、目的とする脳由来の c D N A フラグメントを取得する。

得られた c D N A フラグメントをプローブとして用い、該プローブをアイソトープあるいは蛍光標識し、コロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはプラーク・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラー クローニング 第2版〕等により、目的とする全長 c D N A を取得することができる。

上記の方法により取得された D N A の塩基配列は、該 D N A 断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいはパーキン・エルマー社(Perkin Elmer : 3 7 3 A ・ D N A シークエンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

上記方法により取得される D N A として、例えば、配列番号 1 ～ 8 いずれかに記載の塩基配列からなる D N A をあげることができる。

配列番号 2 に記載の塩基配列からなる D N A を含有するプラスミド p c D N A 3 - S - J S A P 1 b を保有する大腸菌 Escherichia coli JSAP1b/pcDNA3、配列番号 3 に記載の塩基配列からなる D N A を含有するプラスミド p c D N A 3 - S - J S A P 1 c を保有する大腸菌 Escherichia coli JSAP1c/pcDNA3、配列番号 6 に記載の塩基配列からなる D N A を含有するプラスミド p c D N A 3 - S - J S A P 4 を保有する大腸菌 Escherichia coli JSAP4/pcDNA3 および配列番号 7 に記載

の塩基配列からなるDNAを含有するプラスミドpGAD10-JSAP5を保有する大腸菌Escherichia coli JSAP5/pGAD10は平成10年11月6日付けで、配列番号8に記載の塩基配列からなるDNAを含有するプラスミドpcDNA3-His-S-JSAP5を保有する大腸菌Escherichia coli JSAP5/pcDNA3は平成11年11月2日付けで、それぞれFERM BP-6567、FERM BP-6568、FERM BP-6569、FERM BP-6570、FERM BP-6928として、工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）に寄託されている。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。

新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ（FrameSearch）等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

（3）本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセン

ス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号1～8で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。

該オリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度（ T_m ）および塩基数が極端に変わることはない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン

(phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることが

できる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

〔2〕本発明のポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記〔1〕に記載の方法により取得したJ S A Pをコードする本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー クローニング 第2版、カレント プロトコル イン モレキュラ バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子が発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガー・マンハイム社より市販)、pKK233-2 (ファルマシア社製)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 [プロメガ(Promega)社]、pQE-8 (キアゲン(QIAGEN)社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (ストラタジーン社製)、pTrs32

(FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pGEX (ファルマシア社製)、pET-3 (ノバジェン社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社製)、pMAL-c2 (New England Biolabs社製)等をあげることができる。

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P trp)、lacプロモーター (P lac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター (P trp x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6～18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium

saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法[Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)]等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものをを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法[Methods in Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法[Journal of Bacteriology, 153, 163

(1983)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D N A I / A m p (インビトロジェン社製)、pCDNAI、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pAGE107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103 [Journal of Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA、pAS3-3 (特開平2-227075) 等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、S R α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法

[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、モレキュラー バイオロジー ア ラボラトリー マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント プロトコールズ イン モレキュラー バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー クローニング 第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、適切な本発明のポリペプチドを発現させるための発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

(2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌

体、およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方

法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

また、本発明のポリペプチドをF l a g ペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗F l a g 抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

更に、本発明のポリペプチドは、F m o c 法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、t B o c 法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によ

っても製造することができる。

また、アドバンスト・ケムテック (Advanced ChemTech) 社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント (Protein Technology Instrument) 社、シンセセル・ベガ (Synthecell-Vega) 社、パーセプティブ (PerSeptive) 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析 (平野久著、東京化学同人発行、1993年) に記載の方法により実施可能である。

[3] 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

(1) ポリクローナル抗体の調製

上記 [2] に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

抗原とするペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいてペプチド合成機で合成することもできる。

また、上記 [2] に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドを、後述の活性化 JNK3 を用いてリン酸化したポリペプチドの全長またはリン酸化部分を含む部分ポリペプチド断片の精製標品を抗原として用い、動物に投与することにより、リン酸化された本発明のポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体を作製することができる。

リン酸化された本発明のポリペプチドとしては、例えば、配列番号9記載のアミノ酸配列の234、244および255番目のアミノ酸のいずれか1つ以上をリン酸化されたもの、配列番号10記載のアミノ酸配列の243、253および264番目のアミノ酸のいずれか1つ以上をリン酸化されたもの、配列番号11記載のアミノ酸配列の266、276および287番目のアミノ酸のいずれか1

つ以上をリン酸化されたもの、配列番号12記載のアミノ酸配列の265、275および286番目のアミノ酸のいずれか1つ以上をリン酸化されたものをあげることができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)] 等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(2) モノクローナル抗体の調製

(2-1) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1, 200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH 7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(2-2) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5mM)、2-メルカプトエタノール (5×10^{-5} M)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた培地で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(2-3) ハイブリドーマの作製

(2-1)で取得した抗体産生細胞と(2-2)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS（リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1リットル、pH 7.2）でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5～10：1になるよう混合し、1, 200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃

で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を 0.2 ~ 1 ml 添加し、更に 1 ~ 2 分間毎に MEM 培地 1 ~ 2 ml を数回添加する。

添加後、MEM 培地を加えて全量が 50 ml になるように調製する。

該調製液を 900 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4} M)、チミジン (1.5×10^{-5} M) およびアミノプテリン (4×10^{-7} M) を加えた培地〕100 ml 中に懸濁する。

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに $100 \mu\text{l}$ / 穴ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、 37°C で 7 ~ 14 日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている酵素免疫測定法により、上記抗体産生細胞を取得するために、免疫に用いた抗原に特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(2-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返し〔1 回目は HAT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は正常

培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(2-4)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5 mlを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(2-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000 rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。タンパク質量は、ローリー法あるいは280 nmでの吸光度より算出する。

[4] JNK3と結合することのできる新規ポリペプチドを用いた、有用医薬品のスクリーニング法

(1)スクリーニング法に用いるタグポリペプチドと本発明のポリペプチドとの融合ポリペプチドの調製

1) チオレドキシンSタグ (thioredoxin·S-tag、以下、Trx·Sと略す) ペプチドとの融合ポリペプチドの調製

上記[1]で取得されるJNK3と結合することのできるポリペプチド(JSAP)をコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、Trx·S配列を含む発現ベクター、例えば、pET32 (Novagen社製)のTrx·S配列の下流に挿入することにより、Trx·S-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。同様に、Trx·S-ATF2配列を含む発現ベ

クター、例えば、pET32a (Novagen社製) のTrx・S-ATF2配列の下流に挿入することにより、Trx・S-ATF2-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

2) Sタグ (S-tag) ペプチドとの融合ポリペプチドの調製

JSAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、Sタグ配列を含む発現ベクター、例えば、pcDNA3 (Invitrogen社製) にSタグ配列を挿入したs-modified pcDNA3のSタグ配列の下流に挿入することにより、S-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

3) GAL4ADペプチドとの融合ポリペプチドの調製

JSAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、GAL4AD配列を含む発現ベクター、例えば、pGAD10 (Clontech社製) のGAL4AD配列の下流に挿入することにより、GAL4AD-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

4) Flagペプチドとの融合ポリペプチドの調製

JSAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、Flag配列を含む発現ベクター、例えば、pFlag-CMV-2 (Kodak社製)、pcDNA3にFlagタグ配列を挿入したFlag-modified pcDNA3 vector (Invitrogen社製) のFlag配列の下流に挿入することにより、Flag-JSAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペ

チドを取得することができる。

5) グルタチオン S-トランスフェラーゼ (Glutathione S-transferase、以下、GSTと略す) との融合ポリペプチドの調製

J SAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長DNAを、GST配列を含む発現ベクター、例えば、pGEX (Pharmacia社製) あるいはpGEX-3X (Pharmacia社製) のGST配列の下流に挿入することにより、GST-J SAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

得られた発現ベクターを用い、上記[2]に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。該融合ポリペプチドはGlutathione Sepharose 6B(Pharmacia社製) カラム (Pharmacia社製) を用いて精製することができる。

6) Mycタグペプチドとの融合ポリペプチドの調製

J SAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長cDNAを、Mycタグ配列を含む発現ベクター、例えば、Myc-modified pcDNA3 [Mycタグコード配列を該遺伝子の上流につなぎ、タグを付加した該タンパク質を発現させるように改変したpcDNA3 (Invitrogen社製)] のMycタグ配列の下流に挿入することにより、Myc-J SAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

得られた発現ベクターを用い、上記[2]に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

7) His-Sタグペプチドとの融合ポリペプチドの調製

J SAPをコードするcDNAの全長あるいは部分長cDNAを、His-Sタグ配列を含む発現ベクター、例えば、His-S-modified pcDNA3 [His-Sタグコード配列を該遺伝子の上流につなぎ、タグを付加した該タンパク質を発現させるように改変したpcDNA3 (Invitrogen社製)] のHis-Sタグ配列の下流に挿入することにより、His-S-J SAP融合ポリペプチドを発現するベクターを作製することができる。

得られた発現ベクターを用い、上記〔2〕に記載の方法に準じて融合ポリペプチドを取得することができる。

上記1)～7)の方法に準じ、MAPキナーゼカスケードに関わるポリペプチドとの融合ポリペプチドを同様に調製することができる。

(2) 活性化JNK3の調製

上記〔4〕(1)の方法に準じ調製したFlag-JNK3全長あるいは部分長をコードするDNAをpFlag-CMV-2に組み込んだベクターを作製する。

またΔMEKK1 (MEKK1の1169-1488アミノ酸残基を含むペプチドであり恒常的に活性化されているMEKK1)をコードするDNAを発現ベクターpEF-BOSに組み込む。

得られた両発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製)を用いてトランスフェクションし、常法に準じて、COS-7細胞を培養し、Flag-JNK3融合ポリペプチドおよびΔMEKK1を、一過性に発現させる。

培養24-48時間後、細胞を緩衝液B (50mM HEPES (pH 7.5)、150mM NaCl、1% NP-40、10% glycerol、2mM MgCl₂、1mM EGTA、20mM β-glycerophosphate、2mM Na₃VO₄、1mM PMSF、0.2mM DTT)に溶解し、抗Flag抗体カラム (Kodak社製)で活性化Flag-JNK3精製する。

該活性化Flag-JNK3は、20-50%グリセリンを含有した緩衝液あるいはグリセリンを含まない緩衝液中、-20℃~-80℃で保存することが可能で、使用時に解凍して用いることができる。

(3) JNK3結合活性を指標としたスクリーニング系

JNK3と、上記〔2〕で取得した各JSAPとの結合を阻害する活性を有する化合物を見出すことにより、JNK3経路を阻害することができるためアポトーシス等のJNK3経路に起因する疾患の予防、治療に有用である。

以下、各JSAPとJNK3との結合を阻害する活性を有する化合物をスクリ

ーニングする方法について詳述する。

1) スクリーニング系1 (培養細胞を用いる方法)

上記[4] (1)の方法に準じ調製したS-J SAP発現ベクターと、Flag-JNK3発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製)を用いてトランスフェクションし、常法に準じて、被検化合物添加または無添加の条件下で、COS-7細胞を培養し、S-J SAPおよびFlag-JNK3融合ポリペプチドを、一過性に発現させる。

培養24～48時間後、該培養細胞を緩衝液Bに溶解し、Sプロテインアガロース (S-protein agarose) を添加し、S-J SAPおよびS-J SAPと結合するポリペプチドを沈降させ回収する。

該回収ポリペプチド画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P (Millipore社製) にトランスファーする。

該メンブレンおよびプローブとしてanti-Flag M5 monoclonal抗体 (Kodak社製)を用いウエスタンブローディングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (Flag-JNK3) をECL検出システム (Amersham社製) で可視化し、J SAPと結合しているJNK3量を定量化する。

該方法により、被検化合物を入れていない場合の値をコントロールとして、JNK3との結合を阻害する化合物を検出することができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在するタンパク質、人工的に合成されたタンパク質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物 (例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等) の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。後述のスクリーニング法においても、被験試料として同様のものを用いることができる。

2) スクリーニング系2 (ELISA法)

上記〔４〕（１）の方法に準じ調製したGST-JSAP融合ポリペプチドをそのまま、あるいはプロテアーゼfactor Xa (Sigma社製) で切断したJSAPポリペプチド断片を結合反応に使用する。以下、これらポリペプチドをJSAP関連ポリペプチドと呼ぶ。

該ポリペプチドは使用時まで、 $-80\sim-20^{\circ}\text{C}$ でグリセリンを20～50%含有した緩衝液あるいはグリセリンを含まない緩衝液で保存することができ、使用時に解凍して用いる。

上記JSAP関連ポリペプチドを96穴プレートに添加する。

〔４〕（２）で調製した活性化JNK3、または活性化JNK3および被検化合物を、緩衝液、例えば、結合用緩衝液 [binding buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.5% NP-40] に添加し、攪拌する。

得られた攪拌液を上記プレートに添加する。

添加後、 4°C で1～2時間放置する。

放置後、プレートを同緩衝液で3回洗浄し、残存する活性化JNK3を、ELISA法で定量する。

即ち、1次抗体として、例えば、活性化JNK3を認識することのできるPhospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)抗体 (New England Biolabs社製) を使用し、2次抗体として上記抗体を認識することのできる抗体を用い、ELISA法で残存活性化JNK3量を定量することができる。

該方法により、被検化合物を入れていない場合の値をコントロールとして、JNK3との結合を阻害する化合物を検出することができる。

（４）JNK3によるJSAP1のリン酸化を指標としたスクリーニング系

後述の実施例より得られた、a)～c)の知見より、JSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングする方法を確立することは、JNK3経路に起因する疾患の予防、治療に有用な化合物を検出する上で重要である。

a) 活性化されていないJNK3は、脳に選択的に発現しているスキャフォールドポリペプチドJSAP1a、b、c、dに結合している。

b) TNF- α 、IL-1、EGF、LPS等の細胞外の種々のストレスにより、JNK3経路が活性化(MAPKKK \rightarrow MAPKK \rightarrow JNK3)されると、JNK3そのものが活性化(リン酸化)され、活性化されたJNK3はJSAP1a、b、c、dをリン酸化する。

c) JNK3はJSAP1をリン酸化後、JSAP1から解離し、核内へ移行する。

核内へ移行したJNK3は種々の転写因子を活性化して、その細胞をアポトーシスなどへ導くと考えられる。従って、このJNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物を見出せば、JNK3経路を阻害することができ、アポトーシス等のJNK3経路に起因する疾患の予防、治療に有用である。

以下、JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物をスクリーニングする方法について詳述する。

1) スクリーニング系 (cell-free系)

1) -1 スクリーニング系1 (ラジオアイソトープを使用する方法)

① [4] (1) に記載の方法に準じて調製したGST-JSAP1あるいはJSAP1、および② [4] (2) に記載の方法に準じて調製した活性化JNK3、または活性化JNK3および被検化合物を、緩衝液、例えば、緩衝液A [20 mM HEPES、10 mM MgCl₂、5 mM β -mercaptoethanol、0.1 mg/ml BSA (pH 7.4)] に添加、混合し、スクリーニング試験液を調製する。該スクリーニング試験液を96穴プレートに添加する。

添加後、該プレートに[γ -³²P]ATPあるいは[γ -³³P]ATPを添加する。

5～30分間反応後、50 mM EDTAを添加して反応を停止する。

反応停止後、反応液中のポリペプチドを、96ウェルニトロセルロースメンブレンプレート、96ウェルホスホセルロースメンブレンプレート、あるいは96

ウェルP V D Fメンブレンプレートの各ウェルのメンブレンに、吸引ろ過によりトラップし、該メンブレンを同緩衝液で吸引洗浄する。

該メンブレンを液体シンチレーター Microscint-20 (Packard社製) に入れ、メンブレン上の³²Pあるいは³³P放射活性をTop count (Packard社製) でカウントする。

該方法により、被検化合物を入れていない場合のカウントをコントロールとして、JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物を検出することができる。

1) - 2 スクリーニング系2 (ELISA法)

[3]に記載した方法に準じて取得したJSAP1を認識する抗体(1次抗体)を、96穴プレートにコートする。

上記1) - 1に記載した方法に準じて調製したスクリーニング試験液に、ATPを50 μ M添加する。

添加後、室温で5~60分間反応を行い、0.25N HClで反応を停止する。

停止後、0.25N NaOHおよび0.1M Tris-HClを含む溶液(pH 8.0)で中和する。

該中和液の一部一定量を、上記1次抗体でコートしたプレートに添加し、放置する。

放置後、プレートを同緩衝液で洗浄し、[3]に記載した方法に準じて取得したリン酸化されたJSAP1を認識する抗体(2次抗体)を添加する。

常法により2次抗体の量をELISAで定量することにより、リン酸化されたJSAP1の量を定量する。

該方法により、被検化合物を入れていない場合のリン酸化されたJSAP1の量をコントロールとして、JNK3によるJSAP1のリン酸化を阻害する活性を有する化合物を検出することができる。

上記1) - 1および1) - 2の方法により取得される、本発明のポリペプチド

と JNK3 との結合を阻害する化合物または JSAP1 のリン酸化を阻害する活性を有する化合物は、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C07K 14/47, C12N 15/12, 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, A61P 25/28, 25/18, 25/08, 37/00, C12N 15/63 // (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19) (C12N 15/12, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO00/31132 (43) 国際公開日 2000年6月2日 (02.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06487 (22) 国際出願日 1999年11月19日 (19.11.99) (30) 優先権データ 特願平10/332484 1998年11月24日 (24.11.98) JP 特願平11/248442 1999年9月2日 (02.09.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 市村通朗 (ICHIMURA, Michio) [JP/JP] 廣瀬 了 (HIROSE, Ryo) [JP/JP] 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka, (JP) 善岡克次 (YOSHIOKA, Katsuji) [JP/JP] 〒920-0944 石川県金沢市三口新町1-5-1 Ishikawa, (JP)	(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。	
(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE (54) 発明の名称 新規ポリペプチド (57) Abstract Object: to provide diagnostics, preventives and remedies for diseases in association with JNK3 cascade. Means for solution: a novel polypeptide JSAP capable of binding to JNK3; a process for producing this polypeptide; a DNA encoding this polypeptide; a recombinant vector obtained by integrating this DNA; a transformant carrying this recombinant vector; an antibody recognizing the above polypeptide; a method for quantitating the above polypeptide and an immunological staining method with the use of the above antibody; a screening method with the use of the polypeptide; and diagnostics, preventives and remedies for diseases in association with JNK3 cascade with the use of the polypeptide, DNA or antibody as described above.		

(57)要約

【課題】 JNK3カスケードと関連した疾患の診断薬、予防薬、治療薬を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、JNK3に結合する新規ポリペプチドJ SAP、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたスクリーニング法、および該ポリペプチド、該DNAまたは該抗体を用いたJNK3カスケードと関連した疾患の診断薬、予防薬、治療薬を提供することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI セリヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE ジョージア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BS バルバドス	HR クロアチア	MC マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MK 共和国	TR トルコ
CA カナダ	ID インドネシア	ML モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CC 中央アフリカ	IE アイルランド	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	IL イスラエル	MR モリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IN インド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IS アイスランド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IT イタリア	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CN 中国	JP 日本	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CR コスタ・リカ	KE ケニア	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	KG キルギスタン	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KP 北朝鮮	PL ポーランド	
CZ チェコ	KR 韓国	PT ポルトガル	
DE ドイツ		RO ルーマニア	
DK デンマーク			

製することができる。

噴霧剤は、上記で取得されたリン酸化阻害剤または結合阻害剤をそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

[5]本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

(1) 本発明の抗体を用いた発現調節化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の抗体を用いることにより、その細胞中、細胞培養上清中に存在する発現調節化合物を探索、同定することができる。

細胞としては、本発明のポリペプチドを発現している細胞、細胞株、組織ならばいかなるものでも用いることができる。

また、[3]に記載した抗体により免疫学的に検出する方法を用い、該ポリペプチドの発現が認められた細胞、細胞株あるいは組織を用いることができる。

好適な細胞株として、例えば、レチノイン酸で神経細胞様に分化させたマウス由来 P19細胞(ATCC: CRL-1825)をあげることができる。

被験試料としては、上記[4]の被験試料であげたものを用いることができる。

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞と接触させた後、本発明の抗体を用い、該細胞が発現したポリペプチド含量を定量する。抗体を用いて定量する方法としては、例えば下記の免疫細胞染色を利用した方法をあげることができる。

培養付着細胞をPBS緩衝液で洗浄し、0.05%トリプシン、0.02%EDTA(エチレンジアミン4酢酸)を含むPBS緩衝液3mlを加え、余分な溶液を除いた後、37℃、5分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす。

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。

免疫細胞染色を行う細胞を免疫細胞染色用緩衝液(1%BSA、0.02%EDTA、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS)等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^5$ 個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

該プレートに、本発明のモノクローナル抗体を分注する。

モノクローナル抗体としては、[3](2-3)で取得した本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清、[3](2-4)で取得した精製モノクローナル抗体をあげることができる。更に、該モノクローナル抗体を標識した抗体も用いることができる。

モノクローナル抗体を標識した抗体としては、例えばビオチン標識した抗体をあげることができる。

ビオチン標識した抗体は公知の方法(酵素抗体法：学際企画刊1985年)で調製することができる。

上記抗体を、免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように希釈する。

該希釈抗体を $20 \sim 500 \mu\text{l}/\text{穴}$ となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

標識されていない抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝

液を添加し、細胞を洗浄後、F I T C (fluorescein isothiocyanate) あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を $50 \sim 500 \mu\text{l}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で 30 分間遮光して放置する。

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートに F I T C あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビジンを $50 \sim 500 \mu\text{l}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で 30 分間遮光して放置する。

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を良く洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

上記において被験試料を添加せず、同様の操作を行い、得られた解析結果と、被験試料を添加して得られた解析結果とを比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

(2) 本発明のポリペプチド遺伝子の転写産物定量系を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードする mRNA を発現する細胞を被験試料と接触させた後、該 mRNA 含量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードする mRNA を発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現した該 mRNA の含量を、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNA のドットプロットハイブリダイゼーション法、R T - P C R 法等を用い定量する。

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよび R T - P C R 法等に用いることのできるプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子断片をあげることができる。

いることができる。

被験試料として、上記〔4〕のものを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い、常法により宿主細胞を形質転換する。

また、ポジティブセクション用マーカー（G 4 1 8 耐性遺伝子等）およびネガティブセクション用マーカー（単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼやジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子等）をつないだジーンターゲティングベクターを作成し、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の一部をレポーター遺伝子で置換した細胞株を作成することもできる〔Nature, 336, 348 (1988)、Analytical Biochemistry, 214, 77 (1993)、Gene Targeting, The Practical Approach Series, IRL Press (1993)〕。

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子にコードされたポリペプチドの量を、該ポリペプチドに適した方法で検出、定量する。

検出、定量法として、CATの場合には、例えば、モレキュラー クローニング 第2版, 16章, 60頁に記載の方法を、 β -galの場合には、例えば、モレキュラー クローニング 第2版, 16章, 66頁に記載の方法を、lucの場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法, 81 (1994)に記載の方法を、GFPの場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653 (1997)記載の方法等をあげることができる。

上記において被験試料を添加せず、同様の操作を行い、得られた定量結果と、被験試料を添加して得られた定量結果とを比較し、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加あるいは減少させることのできた被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

〔6〕本発明のDNA、ポリペプチド、抗体、結合阻害剤、リン酸化阻害剤およ

び発現調節化合物の利用

(1) 本発明のDNAは、該DNAをプローブとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から1と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

(2) 本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から1と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR [reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)]を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの検出や定量を行うことができる。

該mRNAを定量する方法は、本遺伝子が関与する病態の診断に用いることができる。

各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該mRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織切片に対してin situハイブリダイゼーション [Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)]を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等、より細かい発現分布を知ることができる。

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかに関する情報および細胞がどのような刺激を受けたときに発現量が変化するかに関する情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するために有用である。

(4) 本発明のDNAをプローブとして用い、ゲノムDNAに対してサザンハイ

ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬または予防薬が考えられる。

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、上記〔４〕の本発明のポリペプチドのリン酸化阻害剤または結合阻害剤の医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔４〕の場合と同様の方法で投与することができる。

(７)本発明のオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとして、遺伝子治療に用いることができる。

(８)本発明のポリペプチドを抗原として用い、〔３〕記載の方法により本発明のポリペプチドに対する抗体を製造することができる。

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量することができる。

具体的にはマイクロタイタープレートを用いるＥＬＩＳＡ法、酵素標識抗体法や蛍光抗体法による免疫組織染色、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

具体的には、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエピトープが異なる２種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチＥＬＩＳＡ法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

また、本発明の抗体は病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。

本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量が変化しているかどうかを調べることにより、被験者の神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病など）、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、

てんかん、各種の免疫、炎症性疾患の診断に用いることができる。

(9) 本発明のポリペプチドの機能 (JNK3 スキャフォールド ポリペプチドあるいはJNK3によるリン酸化の基質、あるいはJNK3との結合) を阻害する抗体を投与することにより、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防、治療が可能となる。

本発明の抗体を含有する医薬は、上記 [4] の本発明のポリペプチドのリン酸化阻害剤または結合阻害剤の医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記 [4] の場合と同様の方法で投与することができる。

(10) 本発明のリン酸化阻害剤、結合阻害剤および本発明のポリペプチド遺伝子の発現を調節する化合物は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防、治療として用いることができる。

図面の簡単な説明

第1図 p cDNA3-S-JSAP1a-Δ1の制限酵素地図を示した図である。

第2図 p cDNA3-S-JSAP1a-Δ2の制限酵素地図を示した図である。

第3図 p cDNA3-S-JSAP1a-Δ3の制限酵素地図を示した図である。

第4図 p cDNA3-S-JSAP1a-Δ4の制限酵素地図を示した図である。

- 第5図 p c DNA 3-S-J S A P 1 a-Δ5の制限酵素地図を示した図である。
- 第6図 p c DNA 3-S-J S A P 1 a~p c DNA 3-S-J S A P 1 dの制限酵素地図を示した図である。
- 第7図 p c DNA 3-S-J S A P 3の制限酵素地図を示した図である。
- 第8図 p c DNA 3-S-J S A P 4の制限酵素地図を示した図である。
- 第9図 p G A D 1 0-J S A P 5の制限酵素地図を示した図である。
- 第10図 p c DNA 3-H i s-S-J S A P 5の制限酵素地図を示した図である。
- 第11図 マウス J N K 3、マウス J S A P 1 aの各 c DNAの一部の配列をプローブとしてマウス肝臓、脾臓、腎臓、脳、心臓、肺、精巣の m R N A に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示した電気泳動の図である。発現コントロールとして β -a c t i n の結果も合わせて示した。
- 第12図 J N K 1、J N K 2、J N K 3、E R K 2、p 3 8 に対する J S A P 1 a の結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段は C O S - 7 細胞における各 F l a g - J N K 1、2、3、E R K 2、p 3 8 の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。
- 第13図 J S A P 1 a における J N K 3 結合領域の解析結果を示した電気泳動の図である。図である。
- 第14図 J N K 3 による J S A P 1 a のリン酸化を解析結果を示した電気泳動の図である。
- 第15図 J S A P 1 a のリン酸化と、J N K 3 の細胞内局在性を解析した結果を示した図である。J N K 3 は抗体染色により検出した。細胞の核は Hoechst 染色により検出した。
- 第16図 S E K 1 に対する J S A P 1 a の結合性をウエスタンブローディングに

SAP1aの効果を調べた結果を示す図である。縦軸はJNK3活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。

第22図 P19細胞におけるERK活性をGAL4-E1k1転写活性として測定するLUCレポーター系で、ERK活性に対する Δ Raf1およびJSAP1aの効果を調べた結果を示す図である。縦軸はERK活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。

第23図 COS-7細胞に Δ MEKK1、JNK3遺伝子を単独あるいは両方をいっしょに導入し、得られた Δ MEKK1酵素液、JNK3酵素液、活性化JNK3酵素液を用い、ウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。Aは活性化JNK3の発現をリン酸化型JNK3を認識する抗体で染色した結果を、Bは抗Flag抗体でJNK3を染色した結果を示す。レーン1には Δ MEKK1酵素液、レーン2には活性化JNK3酵素液、レーン3にはJNK3酵素液、レーン4には遺伝子を導入しないCOS-7細胞破砕液を泳動した。

第24図 JNK3に対するJSAP3、4、5の結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。下段はCOS-7細胞における各Flag-JNK3の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。

第25図 ATF2に対するJSAP3の結合性をオートラジオグラフィーにより解析した結果を示した電気泳動の図である。

第26図 35 Sでラベルされた種々の長さを有するJSAP4分子の発現をオートラジオグラフィーにより解析した結果を示した電気泳動の図である。

第27図 JSAP4のJNK3結合領域をオートラジオグラフィーにより解析により解析した結果を示した電気泳動の図である。得られた 35 Sでラベルされた種々の長さを有するJSAP4分子と、GSTあるいはGST-JNK3との結合を解析した結果であり、結合した場合にそれがバンドとして観測される。

第28図 JSAP4のJNK1、JNK2、ERK2への結合性をウエスタンブローディングにより解析した結果を示した電気泳動の図である。3段のブローディングのうち、第2段および第3段はそれぞれCOS-7細胞におけるJSAP4および各MAPK（JNK1、JNK2、JNK3、ERK2）の発現量を確認するため、細胞抽出液を用いたウエスタンブローディングの結果を示している。

第29図 JSAP4のcDNAの一部の配列をプローブとしてマウス精巣、大腸、心臓、肺、腎臓、脳、脾臓、肝臓のmRNAに対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。発現コントロールとして β -actinの結果も合わせて示した。

第30図 COS-7細胞におけるJNK活性をGAL4-c-Jun転写活性として測定するLUCレポーター系で、JNK活性に対するMEKK1、TAK1およびJSAP4の効果を調べた結果を示す図である。縦軸はJNK活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。

第31図 COS-7細胞におけるERK活性をGAL4-Erk1転写活性として測定するLUCレポーター系で、ERK活性に対する Δ Raf1およびJSAP4の効果を調べた結果を示す図である。縦軸はERK活性に対応する、相対的なルシフェラーゼ活性を示した。

[符号の説明]

kb：キロ塩基対 (kilobase pairs)

Ap:アンピシリン耐性遺伝子

knt:キロヌクレオチド (kilonucleotides)

発明を実施するための最良の形態

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

下記実施例における遺伝子操作的手法は、特に断らない限りモレキュラー クロ

ーニング 第2版に記載されている常法に準じて行った。

実施例1 JNK3と結合する活性を有するポリペプチドをコードするcDNAのクローン化

(1) マウス脳由来cDNAライブラリーからのクローン化

マウスJNK3 [Nature Medicine, 3, 89 (1997)] をコードする全長cDNAを、GAL4 DNA結合ドメインをコードする配列を含むクローニングベクターpAS2-1 (Clontech社製) のNcoI-BamHIサイトに組み込み(pAS2-1-JNK3)、酵母CG-1945 (Clontech社製) に導入した。

GAL4転写活性化ドメインをコードする配列を含むクローニングベクターpGAD10 マウス脳cDNAライブラリー (Clontech社製) を、上記pAS2-1-JNK3を導入した酵母に導入し、形質転換酵母を取得した。

該形質転換酵母より、ヒスチジン要求性がなくなった株 (ヒスチジンを含有しない培地で生育してくる)、または β -ガラクトシダーゼ活性を有する株を選択した (一次ポジティブクローン)。

得られた一次ポジティブクローンより、ヒスチジン要求性がなく、かつ β -ガラクトシダーゼ活性を有するクローンを選択した (二次ポジティブクローン)。

得られたクローンからpGAD10由来のプラスミドを回収した。

その結果、上記酵母によるtwo-hybrid systemにより、マウス脳cDNAライブラリーより、配列の異なる4種類の部分長cDNAフラグメントを取得した。

これら得られたフラグメントをプローブとして利用し、常法により λ ZAPIIマウス脳cDNAライブラリー (Clontech社製) をスクリーニングすることにより、JNK3と結合することのできるポリペプチド (JSAP) である、JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1d、JSAP3、JSAP4およびJSAP5をコードする7種類のcDNAクローンを取得した。

JSAP1a、JSAP1b、JSAP1c、JSAP1d、JSAP3およ

びJ S A P 4をコードするc D N Aは全長c D N Aとして取得されたが、J S A P 5をコードするc D N Aは部分長のc D N Aとして取得された。

J S A P 1 a、J S A P 1 b、J S A P 1 c、J S A P 1 d、J S A P 3またはJ S A P 4をコードするc D N Aにはそれぞれ、3, 918 b p、3, 945 b p、4, 014 b p、4, 011 b p、1, 293 b p、4, 527 b pのオープンリーディングフレーム（以下、O R Fと略す）が存在し、それぞれ、1305残基、1314残基、1337残基、1336残基、1508残基のアミノ酸残基をコードしていることが分かった（配列番号1～6）。

またJ S A P 1 a、J S A P 1 b、J S A P 1 c、J S A P 1 dは同一の遺伝子由来のスプライスバリエントであった。即ち、J S A P 1 aにおいて、27 b pの塩基配列が挿入されたものがJ S A P 1 b、3 b pおよび93 b pの塩基配列が挿入されたものがJ S A P 1 c、93 b pの塩基配列が挿入されたものがJ S A P 1 dであった。

具体的には、J S A P 1 bの挿入箇所は、配列番号10の201番目のセリン残基から209番目のセリン残基の9残基のアミノ酸をコードする27 b pのD N A配列部、J S A P 1 cの挿入箇所は、配列番号11の201番目のセリン残基をコードする3 b pのD N A配列部および219番目のバリン残基から249番目のグルタミン残基をコードする31残基のアミノ酸をコードする93 b pのD N A配列部、J S A P 1 dの挿入箇所は、配列番号12の218番目のバリン残基から248番目のグルタミン残基の31残基のアミノ酸をコードする93 b pのD N A配列部である。

J S A P 1 aは既に公知の配列〔配列番号9：1997年日本分子生物学会（12月）〕と一致していた。

J S A P 3は、human C-terminal-binding protein 1（C t B P）〔EMBO J., 17, 5129（1998）〕のマウスホモログであると推定された（配列番号13）。

配列番号14で示されるアミノ酸配列を有するJ S A P 4中には、該アミノ酸

配列 87～121 番目、341～373 番目、658～690 番目、700～732 番目に、WD40-repeat と呼ばれる配列が見られた。

該配列は、他のタンパク質との相互作用（結合）に関与し得ることが予想され、また G-プロテイン（G-protein）といった、細胞内情報伝達を担う分子中にもみられる〔FEBS Lett., 307, 131 (1994)〕。該配列は、後述の実施例より JNK3 経路において、情報伝達に重要な機能を有していることが明らかとなった。

J SAP5 をコードする cDNA は配列番号 7 に示した、734 bp よりなる DNA であった。この cDNA には開始、および終止コドンがなく、部分長であることがわかった。該 cDNA は 244 アミノ酸残基をコードしていた（配列番号 15）。

J SAP5 の全長 cDNA（配列番号 8）を、J SAP5 の cDNA 塩基配列情報を基に作製したプローブを用い、λ ZAPII マウス脳 cDNA ライブラリー

（Clontech 社製）より、常法により、取得した。該 cDNA には 1,455 bp の ORF が存在し、484 残基のアミノ酸残基をコードしていることが分かった（配列番号 16：以下、J SAP5 F と略す）。以下の実験には、J SAP5 F の部分長である J SAP5 の cDNA を用いた。

（2）J SAP の性質の解析に用いる種々のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現するベクターの調製

JNK3 に結合することのできる上記で取得されたポリペプチド J SAP の機能を解析するために、下記のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現するベクターを調製した。

1) チオレドキシン S タグ（thioredoxin・S-tag、以下、Trx・S と略す）ペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

JNK1、JNK2、JNK3 および SEK1 の cDNA は λ ZAPII マウス脳 cDNA ライブラリー（Clontech 社製）より、MEKK1 cDNA は λ ZAPII マウス脾臓 cDNA ライブラリー（Clontech 社製）から常法により取得した。

c-Ra f l c DNAはHealth Science Research Resources Bank, Japan提供のc DNAライブラリーから取得した。

ヒトリンパ球由来のMKK6、p38、ERK2、c-Jun (1-79) およびATF2、マウス胸腺由来のMEK1、MKK7およびCdc42のc DNAをPCR法を用いることにより取得した。

得られた各々のc DNAをpET32a (Novagen社製) のTrx・S配列の下流に挿入し、Trx・S-JNK1、Trx・S-JNK2、Trx・S-JNK3、Trx・S-SEK1、Trx・S-MEKK1、Trx・S-c-Ra f l、Trx・S-MKK6、Trx・S-p38、Trx・S-ERK2、Trx・S-c-Jun、Trx・S-ATF2、Trx・S-MEK1、Trx・S-MKK7またはTrx・S-Cdc42を発現するベクターを各々作製した。

上記(1)で取得したJSAPをコードするDNAまたは該DNAの断片を、発現ベクターpET32a (Novagen社製) のTrx・S配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、Trx・S-JSAP1a、Trx・S-JSAP1b、Trx・S-JSAP1c、Trx・S-JSAP1d、Trx・S-JSAP3、Trx・S-JSAP4、Trx・S-JSAP5を発現するベクターを各々作製した。

挿入した各DNAのコードするポリペプチドおよび各挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

JSAP1a (115~274アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト

JSAP1a (115~504アミノ酸残基) : EcoRIサイト

JSAP1a (268~486アミノ酸残基) : NcoIサイト

JSAP1a (486~744アミノ酸残基) : NcoI-BamHI

JSAP1a (744~1194アミノ酸残基) : BamHIサイト

JSAP1b (115~283アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト

JSAP1c (115~306アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト

J S A P 1 d (115~305アミノ酸残基) : NcoI-BamHIサイト

J S A P 3 (全長) : EcoRI-SalIサイト

J S A P 4 (1042~1331アミノ酸残基) : EcoRI-HindIIIサイト

J S A P 5 (部分長) : EcoRIサイト

また、ATF2の1~107アミノ酸残基をコードするDNAおよびATF2の1~116アミノ酸残基をコードするDNAを、発現ベクターpET32a (Novagen社製)のTrx・S配列の下流にあるBamHI-XhoI、BamHI-XhoIサイトにそれぞれ挿入し、Trx・S-ATF2 (1-107アミノ酸残基)、Trx・S-ATF2 (1-116アミノ酸残基)を調製した。

2) Flagペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

JNK1、JNK2、JNK3、ERK2またはp38をコードする全長のcDNAを哺乳動物発現ベクターpFlag-CMV-2 (Kodak社製)のFlag配列の下流に存在するNotI-BamHIサイトにそれぞれ挿入し、Flag-JNK1、Flag-JNK2、Flag-JNK3、Flag-ERK2またはFlag-p38を発現するベクターを各々作製した。

また、下記ポリペプチドをコードするDNAを、Flag-modified pcDNA3 vectorのFlag配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、Flag-SEK1、Flag-MKK6、Flag-MKK7、Flag-MEK1、Flag-MEKK1、Flag-c-Raf1、Flag-Raf-C、Flag-MEKK-N、Flag-TAK1を発現するベクターを各々作製した。

挿入した各DNAのコードするポリペプチドおよび各挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

SEK1 (全長) : HindIII-XbaIサイト

MKK6 (全長) : HindIII-XbaIサイト

MKK7 (全長) : HindIII-XbaIサイト

MEK1 (全長) : HindIII-XbaIサイト

MEKK1 (全長) : BamHI - EcoRV サイト

c-Raf1 (全長) : EcoRI - XhoI サイト

Raf-N (1-327 アミノ酸残基) : EcoRI - EcoRV サイト

Raf-C (316-648 アミノ酸残基) : EcoRV - XhoI サイト

MEKK-N (1-640 アミノ酸残基) : BamHI - EcoRI サイト

TAK1 (全長) : EcoRI - XhoI サイト

TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) [Science, 270, 2008 (1995)]
をコードするDNAは、マウス細胞株 BAF-B03c DNAライブラリーより常法により取得した。

3) GSTとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

c-Junの1~79アミノ酸残基をコードするDNAをGST融合タンパク質発現ベクターpGEX-3X (Pharmacia社製) のBamHI - EcoRI サイトに挿入し、GST-c-Jun (1-79) 発現ベクターを作製した。

該発現ベクターを用い、常法により*E. coli*を形質転換し、GST-c-Jun (1-79) を発現させた。

発現されたGST-c-Jun (1-79) をGlutathione sepharose 4B (Pharmacia社製)を用いて精製した。

JNK3 (全長) をコードするNcoI (平滑化) - BamHI (平滑化) DNA断片を、GST融合タンパク質発現ベクターpGEX-2T (Pharmacia社製) のBamHI (平滑化) サイトに挿入し、GST-JNK3 発現ベクターを作製した。

該発現ベクターを用い、常法により*E. coli*を形質転換し、GST-JNK3を発現させた。発現させたGST-JNK3をGlutathione sepharose 4B (Pharmacia社製)を用いて精製した。

4) Sタグペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

下記ポリペプチドをコードするDNAまたは該DNAの断片を、発現ベクターS-modified pcDNA3のSタグ配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、

S-J SAP1a、S-J SAP1a Δ 1、S-J SAP1a Δ 2、S-J SAP1a Δ 3、S-J SAP1a Δ 4、S-J SAP1a Δ 5、S-J SAP1b、S-J SAP1c、S-J SAP1d、S-J SAP3、S-J SAP4、S-J SAP4 (1-754)、S-J SAP4 (755-1508)、S-J SAP4 (755-1062)、S-J SAP4 (1063-1331)、S-J SAP4 (1332-1508) を発現するベクターを各々作製した。

挿入した各DNAのコードするポリペプチドおよび各挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

J SAP1a (全長) : NotI サイト
J SAP1a Δ 1 (1-1053アミノ酸残基) : NotI-XhoI
J SAP1a Δ 2 (744-1305アミノ酸残基) : NotI サイト
J SAP1a Δ 3 (1054-1305アミノ酸残基) : BamHI サイト
J SAP1a Δ 4 (343-1053アミノ酸残基) : HindIII-XhoI
J SAP1a Δ 5 (1-343アミノ酸残基) : HindIII サイト
J SAP1b (全長) : NotI サイト
J SAP1c (全長) : NotI サイト
J SAP1d (全長) : NotI サイト
J SAP3 (全長) : EcoRI-XhoI/SalI
J SAP4 (全長) : EcoRI-HindIII
J SAP4 (1-754アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII
J SAP4 (755-1508アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII
J SAP4 (755-1062アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII
J SAP4 (1063-1331アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII
J SAP4 (1332-1508アミノ酸残基) : EcoRI-HindIII。

またJ SAP5のcDNA (部分長) を発現ベクターpGAD10 (Clontech社製) のGAL4AD配列の下流に存在するE c o R Iサイトに、J SAP5F

の cDNA (全長) を発現ベクター His-S-modified pcDNA3 の His-S タグ配列の下流に存在する EcoRV (平滑化) - HindIII サイトに組み込んだ (第 1 ~ 10 図)。

5) JNK3 を発現するベクターの調製

pGEM-3Zf (+) (Promega 社製) を EcoRI で切断後、GCCATGC の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドリンカーを添加して self-ligation を行い、pGEM-3Zf (+) に NcoI サイトを付加したプラスミド pGEM-NCO を作製した。

該 pGEM-NCO の NcoI - BamHI サイトに JNK3 (全長) を挿入し、発現ベクター (pGEM-JNK3) を調製した。

6) 恒常的に活性化された Cdc42 を発現するベクターの調製

恒常的に活性化されている Cdc42 を、点変異導入により Cdc42 の 12 番目のグリシンをバリンに変換することにより作製した [Cdc42 (G12V)]。該 Cdc42 (G12V) (全長) をコードする DNA 断片 (BamHI - 平滑末端) を発現ベクター s-modified pcDNA3 の S タグ配列の下流に存在する BamHI - EcoRV サイトに組み込んだ。

7) 恒常的に活性化された MEKK1 を発現するベクターの調製

ΔMEKK1 (1169 - 1488 アミノ酸残基; MEKK1 の truncated form で恒常的に活性化されている) をコードする cDNA を pEF-BOS vector [Nucleic Acids Res., 18, 5322 (1990)] の XbaI サイトへ組み込んだ。

8) 5XGAL4-LUC レポーター、GAL4-c-Jun、GAL4-E1k1 発現ベクター

5XGAL4-LUC レポーター、GAL4-c-Jun および GAL4-E1k1 発現ベクターはいずれも Stratagene 社から購入し、用いた。

9) RL (Renilla luciferase) コントロールベクター

RL コントロールベクターは Promega 社から購入し、用いた。

10) Mycタグペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製

J SAP 4 (全長) および J SAP 4 (1063-1331 アミノ酸残基) をコードする cDNA をそれぞれ、発現ベクター Myc-modified pcDNA3 の Myc タグ配列の下流に存在する EcoRI-NotI に組み込み、Myc-J SAP 4 (全長) および Myc-J SAP 4 (1063-1331) を発現するベクターを各々作製した。

11) His-Sタグペプチドとの融合ポリペプチドを発現するベクターの調製
下記ポリペプチドをコードする DNA を、His-S タグをコードする発現ベクター His-S-modified pcDNA3 の His-S タグ配列の下流に存在する下記制限酵素サイトに挿入し、MAPK-His-S、MAPKKK-His-S、JNK1-His-S、JNK2-His-S、JNK3-His-S、ERK2-His-S、MEKK1-His-S を発現するベクターを各々作製した。

全長ポリペプチドをコードする各 DNA の挿入制限酵素サイトは以下の通りである。

JNK1 [NotI(平滑化)-BamHI DNA断片] : EcoRV-BamHI

JNK2 [NotI(平滑化)-BamHI DNA断片] : EcoRV-BamHI

JNK3 [NotI(平滑化)-BamHI(平滑化) DNA断片] : EcoRV

ERK2 [BamHI DNA断片] : BamHI

MEKK1 [HindIII DNA断片] : HindIII

実施例2 J SAP 1 a、J SAP 1 b、J SAP 1 c、J SAP 1 d

以下に記載の解析結果は、J SAP 1 a、J SAP 1 b、J SAP 1 c、J SAP 1 d いずれも同一であったため、図には代表して J SAP 1 a の結果を示した。以下、J SAP 1 a、J SAP 1 b、J SAP 1 c および J SAP 1 d を総称して J SAP 1 と記載した。

1) ノーザンハイブリダイゼーションによる JNK3、J SAP 1 mRNA の発現解析

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4972 (1995)に記載されている方法に準じてノーザンハイブリダイゼーションを実施した。

即ち、³²Pで放射ラベルしたJNK3、JSAP1、 β -actin cDNAプローブを用いてマウスの肝臓、脾臓、腎臓、脳、心臓、肺、精巣の各組織について解析した。

結果を第11図に示す。

JNK3は脳特異的に発現が見られた。JSAP1aについては、約6-kbの大きさのJSAP1a mRNAが脳特異的に見られた。

2) 種々のMAPKに対するJSAP1の結合特異性と結合領域の解析

実施例1(2)で調製した、S-JSAP1a、S-JSAP1b、S-JSAP1cまたはS-JSAP1d(全長)発現ベクター、およびFlag-JNK1、Flag-JNK2、Flag-JNK3、Flag-ERK2またはFlag-p38発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1(Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養34時間後、該細胞を緩衝液B中で溶解し、Sプロテインアガロース(Novagen社製)を添加し、S-JSAP1およびS-JSAP1と結合するポリペプチドを沈降させ回収した。

得られた回収画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P(Millipore社製)にトランスファーした。

該メンブレンおよびプローブとしてanti-Flag M5 monoclonal抗体(Kodak社製)を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するポリペプチド(Flag-JNK3)をECL検出システム(Amersham社製)で可視化し、JSAP1と結合可能なMAPKを調べた。

結果を第12図に示す。JSAP1はJNK3とのみ結合し、他のMAPKとは結合しないことがわかった。

JNK3とのJSAP1結合領域を以下の方法で解析した。

実施例1(2)で調製した発現ベクターを用い、Trx・SとJSAP1の部分断片との融合ポリペプチドTrx・S-JSAP1(断片)を常法に従って、*E. coli*で発現させ、Sプロテインアガロースに結合させ取得した。

実施例1(2)で調製した発現ベクターpGEM-JNK3を用い、全長JNK3の³⁵S放射能ラベル体を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega社製)により*in vitro*翻訳により調製した。

得られたJNK3の³⁵S放射能ラベル体と、Trx・S-JSAP1(断片)を緩衝液A[50mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、0.5% NP-40]中で混合し、4℃で2時間、チューブを回転させながら反応液を攪拌し反応させた。

反応後、緩衝液Aで3回洗浄し、得られた沈降物をSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィー(autoradiography)により解析した。

その結果、JNK3とのJSAP1の結合領域は、115~274(JSAP1a)、115~283(JSAP1b)、115~306(JSAP1c)、115~305(JSAP1d)番目のアミノ酸残基領域に存在することがわかった。

JSAP1aでの結果を第13図に示した。JSAP1aでは結合領域は115~274番目のアミノ酸残基であった。

3) JNK3によるJSAP1のリン酸化と、該リン酸化によるJNK3の結合能の欠失

JNK3とのJSAP1の結合領域には、下記のようにproline-directed serine/threonine kinaseによるリン酸化を受ける可能性のあるスレオニン残基が存在する。

JSAP1a: 234、244、255番目のアミノ酸残基

JSAP1b: 243、253、264番目のアミノ酸残基

J S A P 1 c : 2 6 6、2 7 6、2 8 7 番目のアミノ酸残基

J S A P 1 d : 2 6 5、2 7 5、2 8 6 番目のアミノ酸残基

上記リン酸化を受けると推定される箇所を含む J S A P 断片と T r x · S との融合ポリペプチド、T r x · S - J S A P 1 a (115-274 アミノ酸残基)、T r x · S - J S A P 1 b (115-283 アミノ酸残基)、T r x · S - J S A P 1 c (115-306 アミノ酸残基)、T r x · S - J S A P 1 d (115-305 アミノ酸残基) を実施例 1 (2) に従って調製した。

実施例 1 (2) で取得した F l a g - J N K 3 発現ベクターおよび Δ M E K K 1 発現ベクターを、あるいは F l a g - J N K 3 発現ベクターのみを C O S - 7 細胞に TransIT-LT1 (Mirus 社製) を用いてトランスフェクションした後、該 C O S - 7 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

34 時間培養後、該細胞を緩衝液 B 中で溶解し、プロテイン G アガロース (protein-G-agarose) に固定化した anti-Flag M5 モノクローナル抗体 (Kodak 社製) を用いて F l a g - J N K 3 を免疫沈降させた。

得られた J N K 3 あるいは活性化された J N K 3 と、S プロテインアガロースに結合させた、上記で調製した T r x · S - J S A P 1 a (115-274 アミノ酸残基)、T r x · S - J S A P 1 b (115-283 アミノ酸残基)、T r x · S - J S A P 1 c (115-306 アミノ酸残基) または T r x · S - J S A P 1 d (115-305 アミノ酸残基) を用い、Cell, 76, 1025 (1994) に記載されている方法に準じて、 32 P で放射ラベルされた ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP) を加えリン酸化反応を行った。リン酸化のポジティブコントロールとして、G S T - c - J u n (1-79 アミノ酸残基) を基質として用いた [EMBO. J., 15, 2760 (1996)]。

該反応液を S D S - P A G E で展開後、オートラジオグラフィーにより解析した。

結果を第14図に示す。JSAP1は効率的にリン酸化された(第14図のレーン4)。ポジティブコントロールであるc-Junのリン酸化も確認された(第14図のレーン2)。

JSAP1においてリン酸化を受けている可能性のある上記に示したスレオニン残基を、それぞれアラニン残基へ、オーバーラッピングPCR法[overlapping PCR; Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1989)]による部位特異的変異により変換し、変換させた該ポリペプチドを実施例1(2)の方法に準じて発現させ、取得した。

取得したポリペプチドWT~T-3は以下の通りである。

(i) Trx·S-JSAP1a (115-274アミノ酸残基領域)

WT : アラニン残基への置換なし

T-0 : 234、244、255番目をアラニン残基に置換

T-1 : 244、255番目をアラニン残基に置換

T-2 : 234、255番目をアラニン残基に置換

T-3 : 234、244番目をアラニン残基に置換

(ii) Trx·S-JSAP1b (115-283アミノ酸残基領域)

WT : アラニン残基への置換なし

T-0 : 243、253、264番目をアラニン残基に置換

T-1 : 253、264番目をアラニン残基に置換

T-2 : 243、264番目をアラニン残基に置換

T-3 : 243、253番目をアラニン残基に置換

(iii) Trx·S-JSAP1c (115-306アミノ酸残基領域)

WT : アラニン残基への置換なし

T-0 : 266、276、287番目をアラニン残基に置換

T-1 : 276、287番目をアラニン残基に置換

T-2 : 266、287番目をアラニン残基に置換

4) 種々のMAPKK、MAPKKKとJSAP1との結合

実施例1(2)で取得したS-JSAP1(全長)発現ベクター、MAPKKであるSEK1(MKK4)のFlag融合ポリペプチドFlag-SEK1の発現ベクターおよびΔMEKK1発現ベクターの3種類のベクター、あるいはS-JSAP1(全長)発現ベクターおよびFlag-SEK1発現ベクターの2種類のベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1(Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

34時間培養後、細胞を緩衝液B中で溶解させ、S-protein agarose (Novagen社製)を用い、S-JSAP1およびS-JSAP1と結合するポリペプチドを免疫沈降させた。

得られた回収画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P (Millipore社製)にトランスファーし、anti-Flag M5 monoclonal抗体(Kodak社製)をプローブとして、Flag-SEK1をECL検出システム(Amersham社製)で可視化した。

結果を第16図に示す。ΔMEKK1によってSEK1が活性化された場合に、JSAP1との結合が見られた(第16図のレーン2および3)。ΔMEKK1によるSEK1の活性化は、リン酸化され活性化されたSEK1を認識するモノクローナル抗体(NEB社製)を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。

上記で得られた結果を基に、JSAP1中の、SEK1結合領域について、上記と同様の方法で解析した。即ち、S-JSAP1の種々の欠失変異体を作製し、それぞれとFlag-SEK1との結合を調べた。

JSAP1a由来の欠失変異体を用いて得られた結果を第16図のレーン4～8に示す。JSAP1aの全長FL(1-1305残基)、欠失変異体Δ2(744-1305残基を有する)および欠失変異体Δ3(1054-1305残基を有する)にSEK1は結合することができたが(第16図のレーン5、7、8)、

欠失変異体 $\Delta 1$ (1-1053残基を有する)には結合することができなかった (第16図レーン6)。

以上のことから、JSAP1aのC末端側の1054~1305アミノ酸残基にSEK1が結合することがわかった。

他のMAPKKのJSAP1aへの結合についても同様の方法で解析した。

結果を第17図および第18図に示す。

MKK7 (JNK経路の他のMAPKK) もSEK1と同様にJSAP1aのC末端の1054-1305残基に結合した (第17図)。ERKまたはp38経路のMAPKKであるMEK1、MKK6もJSAP1aに結合した (第18図)。

実施例1(2)で取得したS-JSAP1a (全長) FL、欠失変異体 $\Delta 1$ (1-1053アミノ酸残基を有する)、または $\Delta 4$ (343-1053アミノ酸残基を有する)の発現ベクター、およびMAPKKKであるMEKK1のN末端部分配列ポリペプチド (MEKK1-N; 1-640アミノ酸残基) とFlagタグとの融合ポリペプチドFlag-MEKK-Nの発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製) を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

上記において、全長のMEKK1のCOS-7細胞での発現は非常に低かったため、本実験においてはMEKK1の部分配列であるMEKK1-Nを用いた。

結果を第19図に示す。MEKK-NはJSAP1aのFL、 $\Delta 1$ 、 $\Delta 4$ いずれとも結合した。 $\Delta 4$ に結合したことより、MEKK-NはJSAP1aの343-1053アミノ酸残基部に結合すると考えられた。

同様の実験を、MEKK1のN末端部以外の部分を有するポリペプチドを用いて行い、該ポリペプチドが上記N末端部以外の領域でJSAP1aと結合しないことを確認した。

MEKK1は、全長JSAP1aよりもJSAP1a Δ 1(1-1053アミノ酸残基)に、より高親和性で結合している(第19図のレーン3)ことより、上記でSEK1の結合部位と考えられたJSAP1aのC末端の1054-1305残基は、MEKK1の結合を阻害する作用のある可能性がある。

さらに、MAPK経路のうち、ERK経路に関与しているMAPKKKである、c-Raf1とJSAP1との結合について調べた。

実施例1(2)で取得したc-Raf1のN末端側領域(1-327アミノ酸残基)またはC末端側領域(316-648アミノ酸残基)をFlagペプチドと融合させたFlag-Raf-NまたはFlag-Raf-Cを発現するベクターおよび実施例1(2)で取得したS-JSAP1各々の発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1(Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

上記において、全長のc-Raf1のCOS-7細胞での発現は非常に低かったため、本実験においてはc-Raf1の部分配列であるRaf-NおよびRaf-Cを用いた。

結果を第20図に示す。Raf-CはJSAP1(第20図のレーン4)と結合したが、Raf-Nは結合しなかった(第20図のレーン2)。また、Raf-Cの結合親和性はMEKK1の親和性より低かった(第20図のレーン4、6)。

以上からJNK3経路に関与する、MAPKKK(MEKK1)、MAPK(SEK1、MKK7)、MAPK(JNK3)のJSAP1の結合領域は互いに異なることがわかった。

JSAP1aにおいて、MEKK1に対する結合領域は343-1053アミノ酸残基領域、SEK1、MKK7に対する結合領域は1054-1305残基領域、JNK3に対する結合領域は115-274残基領域であった。

JSAP1はロイシンジッパー構造を有していると考えられた。ロイシンジッ

パー構造を形成しているロイシン残基の各JSAP1中のアミノ酸配列番号を以下に示す。

JSAP1a: 392、399、406、413、420、427

JSAP1b: 401、408、415、422、429、436

JSAP1c: 424、431、438、445、452、459

JSAP1d: 423、430、437、444、451、458

以上のことから、JSAP1はホモ、あるいはヘテロダイマーとして存在し、機能していると考えられた。

5) レポーター系を用いたJSAP1のJNK3経路におけるスキャフォールドタンパク質としての機能解析

全長JSAP1の過剰発現によるJNK3経路の活性化に関して解析した。

JSAP1aおよびJNK3をもともと発現している、レチノイン酸によって分化させたP19細胞に、5XGAL4-LUCレポーター発現ベクター

(Stratagene社製)、GAL4-c-Jun発現ベクター(c-Jun活性化ドメインを含む1-223残基、Stratagene社製)およびRLコントロールベクター(Promega社製)を導入した。

該P19細胞に、全長S-JSAP1a-FL発現ベクター、S-JSAP1a-Δ5(1-343残基)発現ベクターおよび/または恒常的に活性化されているS-Cdc42(G12V)発現ベクターを導入した。

該P19細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養24時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、GAL4-c-Jun転写活性、即ち、JNK3活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、RLルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

結果を第21図に示す。

Cdc42(G12V)はJNK3活性を上昇させ、またJSAP1aの過剰

発現はC d c 4 2 (G 1 2 V)と同程度にJ N K 3活性を上昇させた。

C d c 4 2 (G 1 2 V)と全長J S A P 1 aを同時に発現させた細胞では、それぞれ単独の場合と相加的にJ N K 3活性を上昇させた。

これに対し、J N K 3結合領域を含むJ S A P 1 a-Δ5 (1-343アミノ酸残基)とC d c 4 2 (G 1 2 V)を同時に発現させた場合は、J N K 3活性は阻害された。

上記と同様の方法で、全長J S A P 1の過剰発現によるE R K経路への影響を調べた。

レチノイン酸によって分化させたP 1 9細胞に、5 X G A L 4-L U Cレポーター発現ベクター、G A L 4-E l k 1 (E l k 1活性化ドメインを含む307-427残基)発現ベクターおよびR Lコントロールベクターを導入した。

該P 1 9細胞に、S-J S A P 1 a-F L (全長J S A P 1 a)発現ベクターおよび/または恒常的に活性化されているΔ R a f 1 [Mol. Cell. Biol., 9, 639 (1989)]のF l a gポリペプチド (F l a g-Δ R a f 1)発現ベクターを導入した。

該P 1 9細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養24時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、G A L 4-E l k 1転写活性、即ち、E R K活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、R Lルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

結果を第22図に示す。

J S A P 1 aの過剰発現は、E R K活性を阻害することが明らかとなった。

J S A P 1はJ N K 3経路に存在するM A K P K K K、M A P K KおよびJ N K 3のすべてと結合し、また上記結果より、J N K 3経路の効果的、かつ特異的な活性化を担う重要なスキャフォールドポリペプチドとして機能していると結論された。

ミドpRH1001を取得した。

該pRH1001でE. coliのコンピテント細胞をトランスホーム後、該E. coliをアンピシリンを添加したLB培地プレート（トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、NaCl 1%）で一晩培養した。

現れたコロニーより得られたE. coliを2mlのアンピシリンを添加したTB培地〔トリプトン 12g、酵母エキス 24g、グリセロール 4mlに900mlの水を加え、オートクレーブ滅菌し、60℃に冷却後、滅菌した100mlリン酸カリウム溶液（0.17M KH_2PO_4 、0.72M K_2HPO_4 ）を添加した培地〕中で培養し、該E. coliよりpRH1001を抽出した。

該pRH1001をEcoRIとEcoRVで切断し、得られたDNA断片の塩基配列を決定することにより、JSAP1aをコードする塩基配列と一致することを確認した。

EcoRIとEcoRVで切断したpRH1001のDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、該断片をQiaex II DNA Extraction Kit (Qiagen社製)により抽出した。

同様に、制限酵素EcoRIとSmaIで切断したpGEX-3X (Pharmacia社製)のDNA断片を抽出した。

得られた直鎖状のpGEX-3XのDNA断片とpRH1001のDNA断片を、DNA ligation Kit (宝社製)を用い、16℃でligation反応を行なうことにより、連結し、pBluescript II KSにJSAP1a DNA断片を挿入したプラスミドpRH1003を取得した。

該pRH1003でE. coliのコンピテント細胞をトランスホーム後、該E. coliをアンピシリンを添加したLB培地プレート上で一晩培養した。

現れたコロニーより得られたE. coliを2mlのアンピシリンを添加したTB培地中で培養し、該E. coliよりpRH1003を抽出した。

pRH1003はGST-JSAP1融合タンパク質をコードするDNA断片

9 μ l のFuGene 6 transfection reagent (F. Hoffmann-La Roche社製) を 300 μ l のOPTI-MEM (Gibco BRL, Life Technologies社製) に加え、得られた溶液に、実施例 1 の (2) で調製した Δ MEKK1 をコードする cDNA を導入した発現ベクター 0.1 ~ 0.5 μ g および / または JNK3 をコードする cDNA を導入した発現ベクター 4.5 ~ 4.9 μ g を添加し、15 分間室温で放置した。

得られた混合液を、上記培養 COS-7 細胞に 3 滴ずつ加えゆっくりと混ぜた後、該細胞を 37℃ で 30 ~ 40 時間培養した。

該細胞をスクレイパーで回収し、10 ml の PBS で洗浄した。

得られた COS-7 細胞に 1 ml の細胞溶解緩衝液 [50 mM HEPES / NaOH (pH 7.6)、150 mM NaCl、0.3% (V/V) Nonidet P-40、20 mM MgCl₂、1 mM ethyleneglycol bis(β -aminoether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)、20 mM β -glycerophosphate、10 mM Na₃VO₄、10 mM NaF、40 μ g / ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 μ g / ml pepstatin A、1 μ g / ml leupeptin、1 μ g / ml chymostatin、2 mM dithiothreitol (DTT)] を加え、細胞を破壊した。

得られた細胞破壊液を、20,000 \times g、4℃ の条件で遠心分離し、上清を取得した。 Δ MEKK1 をコードする cDNA を導入した発現ベクター導入由来の細胞破壊液の上清を Δ MEKK1 酵素溶液として、JNK3 をコードする cDNA を導入した発現ベクター導入由来の細胞破壊液の上清を JNK3 酵素溶液として、 Δ MEKK1、JNK3 をコードする cDNA を導入した 2 種類の発現ベクター導入由来の細胞破壊液の上清を活性化 JNK3 酵素溶液として用いた。

以下に、活性化 JNK3 による JSAP1 のリン酸化を阻害する阻害剤のスクリーニングする系について記述する。

活性化 JNK3 による JSAP1 のリン酸化は、活性化 JNK3、[γ -³³P]-ATP (74 TBq/mmol, New England Nuclear社製)、および GST-JSAP1 を用いた均質な液相系で反応後、GST-JSAP1 への ³³P の取り込み放射活

線を示し、Lineweaver-Burk plotより、ATP、GST-JSAP1のKm値はそれぞれ、 $6.3 \mu\text{M}$ 、 $0.48 \mu\text{M}$ であることがわかった。

実施例3 JSAP3のJNK3への結合

実施例1(2)で取得したS-JSAP3(全長)発現ベクターおよびFlag-JNK3発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1(Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養34時間後、該細胞を緩衝液B中で溶解し、Sプロテインアガロースを添加し、S-JSAP3およびS-JSAP3と結合するポリペプチドを沈降させた。

得られた回収画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P(Millipore社製)にトランスファーした。

該メンブレンおよびプローブとしてanti-Flag M5 monoclonal抗体(Kodak社製)を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するポリペプチド(Flag-JNK3)をECL検出システム(Amersham社製)で可視化した。

結果を第24図に示す。

JSAP3はJNK3結合することが確認された(第24図のレーン2)。

以下の方法で、JSAP3の転写因子ATF2との結合およびATF2結合領域の解析を行った。

実施例1(2)に記載の方法に準じて、JSAP3(全長ポリペプチド)、Trx·S、Trx·S-ATF2(アミノ酸残基1-107)およびTrx·S-ATF2(アミノ酸残基1-116)融合ポリペプチドをE. coliで発現させ、Sプロテインアガロースに結合させることによりそれぞれ取得した。

実施例1(2)で取得したS-JSAP3(全長)発現ベクターを使用して、S-JSAP3の ^{35}S 放射能ラベル体を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System(Promega社製)によりin vitro翻訳により調

製した。

得られたJSAP3の³⁵S放射能ラベル体と、Trx・S、Trx・S-ATF2（アミノ酸残基1-107）、Trx・S-ATF2（アミノ酸残基1-116）それぞれを緩衝液A中で混合し、4℃で2時間、チューブを回転させながら反応液を攪拌し、反応させた。

反応後、緩衝液Aで3回洗浄し、得られた沈降物をSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィー（autoradiography）により解析した。

結果を第25図に示した。

JSAP3はATF2の108-116アミノ酸残基の領域に結合することがわかった。

JSAP3のATF2結合領域108-116残基のうち、108-112の配列は、すでに報告されているCtBP結合配列motifPLDLSと完全に一致した〔J. Biol. Chem., 273, 8549 (1998)〕。

実施例4 JSAP4

1) JSAP4のJNK3への結合

実施例1(2)で取得したS-JSAP4（全長）発現ベクターおよびFlag-JNK3発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1(Mirus社製)を用いてトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養34時間後、該細胞を緩衝液B中で溶解し、Sプロテインアガロースを添加し、S-JSAP4およびS-JSAP4と結合するポリペプチドを沈降させた。

得られた回収画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P (Millipore社製) にトランスファーした。

該メンブレンおよびプローブとしてanti-Flag M5 monoclonal抗体 (Kodak社製) を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (Flag

g-JNK3)をECL検出システム(Amersham社製)で可視化した。

結果を第24図に示す。

J SAP 4はJNK3結合することが確認された(第24図のレーン4)。J SAP 4のJNK3結合領域を以下の方法で解析した。

実施例1(2)で取得したGSTあるいはGST-JNK3融合タンパク質発現ベクターを*E. coli*中で発現させ、該タンパク質をGlutathione-agarose(Sigma社製)に吸着させた。

実施例1(2)で取得した全長、あるいは部分長のJ SAP 4のS-J SAP 4発現ベクターを使用して、種々のS-J SAP 4の³⁵S放射能ラベル体を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System(Promega社製)により*in vitro*翻訳により調製し、SDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィー(autoradiography)により解析した。

結果を第26図に示した。

緩衝液Aを含むチューブに、得られた種々のJ SAP 4の³⁵S放射能ラベル体、およびGlutathione-agaroseに吸着させたGSTあるいはGST-JNK3融合タンパク質添加し、チューブを回転させながら混合し、4℃で2時間放置した。

放置後、緩衝液Aで3回洗浄し、Glutathione-agaroseに吸着しているタンパク質をSDS-PAGEで展開し、オートラジオグラフィーにより解析した。

結果を第27図に示した。

J SAP 4の1063-1331アミノ酸残基領域にJNK3が結合することが判明した。

2) J SAP 4のJNK1、JNK2への結合

実施例1(2)で取得したMycタグを付加したMyc-J SAP 4(1063-1331アミノ酸残基領域;JNK3と結合する領域)発現ベクターおよび、His-Sタグを付加したHis-S-JNK1、His-S-JNK2、His-S-JNK3またはHis-S-ERK2発現ベクターを、COS-7細胞

にFuGene 6 transfection reagent (F. Hoffmann-La Roche社製) を用いてコトランスフェクションした。

該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養34時間後、該細胞を緩衝液B中で溶解し、S-protein agarose (Novagen社製)を用い、免疫沈降させた。

得られた沈降画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P (Millipore社製) にトランスファーした。

該メンブレンおよびプローブとしてanti-Myc monoclonal抗体 9E10 (Boehringer Mannheim社製)を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するMyc-JSAP4をECL検出システム (Amersham社製) で可視化した。またそれぞれのコトランスフェクションされた細胞中のMyc-JSAP4の発現は、細胞溶解後、anti-Myc monoclonal抗体 9E10 (Boehringer Mannheim社製) によるウエスタンブロッティングにより、またHis-S-JNK1、His-S-JNK2、His-S-JNK3およびHis-S-ERK2の発現はanti-His polyclonal抗体 (Santa Cruz社製) によるウエスタンブロッティングにより確認した。

その結果を第28図に示した。

JSAP4はJNK1、JNK2、JNK3と結合するが、ERK2とは結合しないことが判明した。

3) ノーザンハイブリダイゼーションによるJSAP4 mRNAの発現解析

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4972 (1995)に記載されている方法に準じてノーザンハイブリダイゼーションを実施した。

即ち、³²Pで放射ラベルした、JSAP4、 β -actin cDNAプローブを用いてマウスの精巣、大腸、心臓、肺、腎臓、脳、脾臓、肝臓の各組織について解析した。

結果を第29図に示す。

J S A P 4 は精巣、心臓、腎臓でわずかな発現が認められたが、特に脳に最も多い発現が見られた。

J S A P 4 には W D 4 0-repeat と呼ばれる配列が見られるため、他のタンパク質との相互作用（結合）に関与し得ることが予想され、J N K 3 経路において、その情報伝達で重要な機能を有していることが予想された [FEBS Lett., 307, 131 (1994)]。

4) レポーター系を用いた J S A P 4 の J N K 経路における機能解析

全長 J S A P 4 を過剰発現させ J N K 経路への影響を以下の方法で解析した。

C O S-7 細胞に、5 X G A L 4-L U C レポーター発現ベクター (Stratagene 社製)、G A L 4-c-J u n 発現ベクター (c-J u n 活性化ドメインを含む 1-223 残基、Stratagene 社製) および R L コントロールベクター (Promega 社製) を FuGENE6 transfection reagent (F. Hoffmann-La Roche 社製) を用いて導入した。

該 C O S-7 細胞に、実施例 1 の (2) で作製した M y c-J S A P 4-F L 発現ベクター、H i s-S-M E K K 1 発現ベクターおよび F l a g-T A K 1 発現ベクターのいずれか一つ以上を FuGENE6 transfection reagent を用いて導入した。

該 C O S-7 細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養 34 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、G A L 4-c-J u n 転写活性、即ち、J N K 活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、R L ルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

結果を第30図に示す。

J S A P 4 そのものだけでは、J N K 活性の上昇はわずかであったが、M A P K K K である M E K K 1、T A K 1 は J N K 活性をそれぞれ 3 倍、3.2 倍に上

昇させた。しかし、MEKK1およびTAK1によるJNK活性化は、JSAP4の過剰発現によってそれぞれさらに2.7倍、3倍に増強された。

上記と同様の方法で、全長JSAP4の過剰発現によるERK経路への影響を調べた。

COS-7細胞に、5XGAL4-LUCレポーター発現ベクター、GAL4-E1k1 (E1k1活性化ドメインを含む307-427残基) 発現ベクターおよびRLコントロールベクターをFuGENE6 transfection reagentを用いて導入した。

該COS-7細胞に、実施例1の(2)で作製したMyc-JSAP4-FL発現ベクター、および/または恒常的に活性化されているΔRaf1 [Mol. Cell. Biol., 9, 639 (1989)] のFlagポリペプチド (Flag-ΔRaf1) 発現ベクターをFuGENE6 transfection reagentを用いて導入した。

該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養34時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、GAL4-E1k1転写活性、即ち、ERK活性を求めた。ルシフェラーゼ活性の相対値は、RLルシフェラーゼの活性値で補正して求めた。

結果を第31図に示す。

JSAP4の過剰発現は、ERK経路の活性に対して影響しなかった。また活性化型ΔRaf-1によるERK活性化に対しても影響しなかった。

実施例4の1)、2)の結果より、JSAP4はJNK1、JNK2、JNK3に結合し、かつそれらJNK経路の活性化の効率を特異的により増強するという機能を有していると結論された。

実施例5 JSAP5のJNK3への結合

実施例1(2)で取得したS-JSAP5 (部分長) 発現ベクターおよびFlag-JNK3発現ベクターをCOS-7細胞にTransIT-LT1 (Mirus社製) を用い

てトランスフェクションした後、該COS-7細胞を培養し、導入した各ベクター由来のポリペプチドを一過性に発現させた。

培養34時間後、該細胞を緩衝液B中で溶解し、Sプロテインアガロースを添加し、S-JSAP5およびS-JSAP5と結合するポリペプチドを沈降させた。

得られた回収画分をSDS-PAGEで展開し、メンブレンImmobilon-P (Millipore社製) にトランスファーした。

該メンブレンおよびプローブとしてanti-Flag M5 monoclonal抗体 (Kodak社製) を用いウエスタンブロッティングを行い、該抗体と結合するポリペプチド (Flag-JNK3) をECL検出システム (Amersham社製) で可視化した。

結果を第24図に示す。

JSAP5はJNK3結合することが確認された (第24図のレーン6)。

産業上の利用可能性

本発明により得られるJNK3結合活性を有する新規ポリペプチドのDNAを用いることにより、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防、治療が可能となる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号17-人工配列の説明：合成DNA

配列番号18-人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

1. 配列番号10～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
2. 配列番号14～16のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチド。
3. 請求項1または2記載のポリペプチドをコードするDNA。
4. 配列番号2～8のいずれか1つに記載の塩基配列から選ばれる塩基配列からなるDNA。
5. 配列番号6～8のいずれか1つに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつc-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチドをコードするDNA。
6. 請求項3～5のいずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。
7. 組換え体DNAが、プラスミドp cDNA3-S-JSAP1b、p cDNA3-S-JSAP1c、p cDNA3-S-JSAP4、pGAD10-JSAP5およびp cDNA3-His-S-JSAP5から選ばれる組換え体DNAである、請求項6記載の組換え体DNA。
8. 請求項6または7記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。
9. 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体である、請求項8記載の形質転換体。
10. 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、請求項9記載の形質転換体。
11. Escherichia属に属する微生物が、Escherichia coli JSAP1b/pcDNA3 (FERM BP-6567)、Escherichia coli JSAP1c/pcDNA3 (FERM B

P-6568)、Escherichia coli JSAP4/pcDNA3 (FERM BP-6569)、Escherichia coli JSAP5/pGAD10 (FERM BP-6570) および Escherichia coli JSAP5/pcDNA3 (FERM BP-6928) から選ばれる微生物である、請求項10記載の形質転換体。

12. 請求項8～11のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1または2記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項1または2記載のポリペプチドの製造方法。

13. 請求項3～5および配列番号5記載の塩基配列からなるDNAのいずれか1項に記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

14. 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボ

ースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、請求項 13 記載のオリゴヌクレオチド。

15. 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出する方法。

16. 請求項 13 または 14 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

17. 請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを認識する抗体。

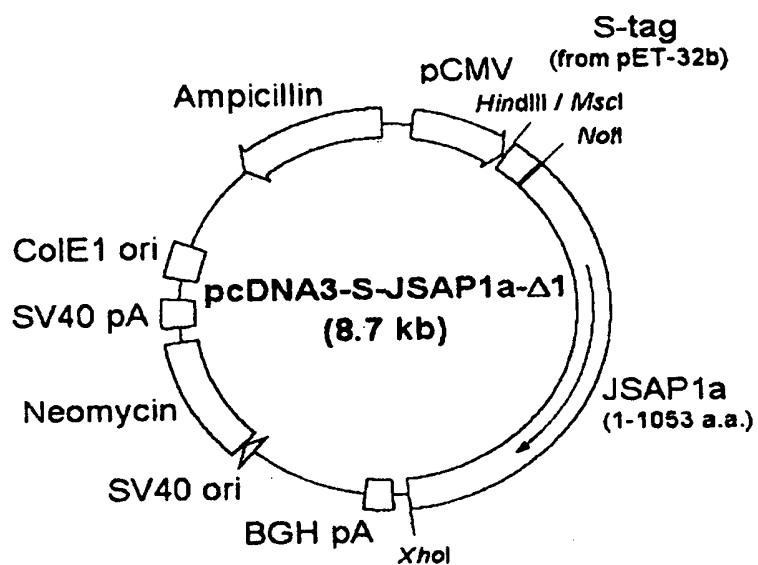
18. 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

19. 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの免疫組織染色法。

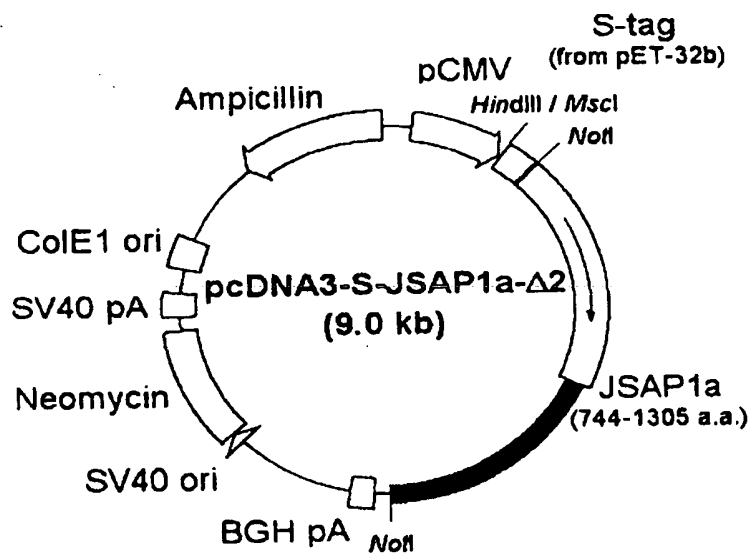
20. 請求項 17 記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

21. 配列番号 9～16 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 9～16 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチド、JNK3 および被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドと JNK3 との結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。

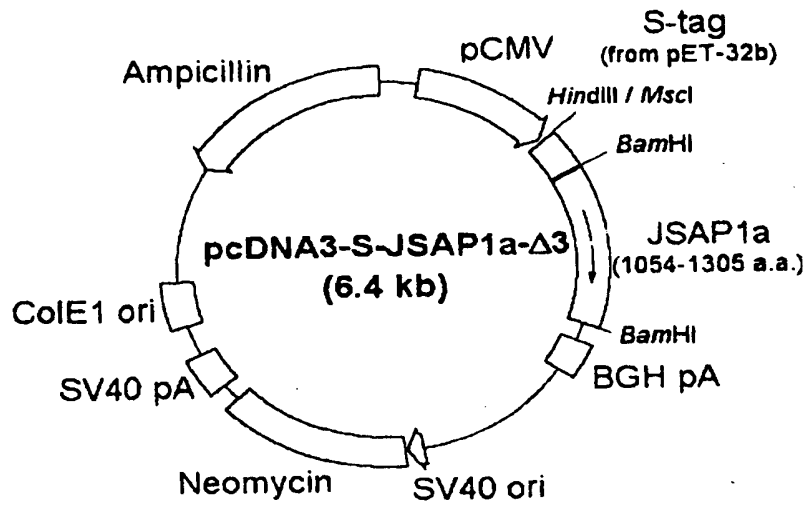
22. 配列番号 9～16 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列からなるポリペプチドまたは配列番号 9～16 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) と結合することのできるポリペプチド、活性化された JNK3 および被験試料とを接触させることを特徴とする、活性化された JNK3 による、該ポリペプチドのリン酸化を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法。



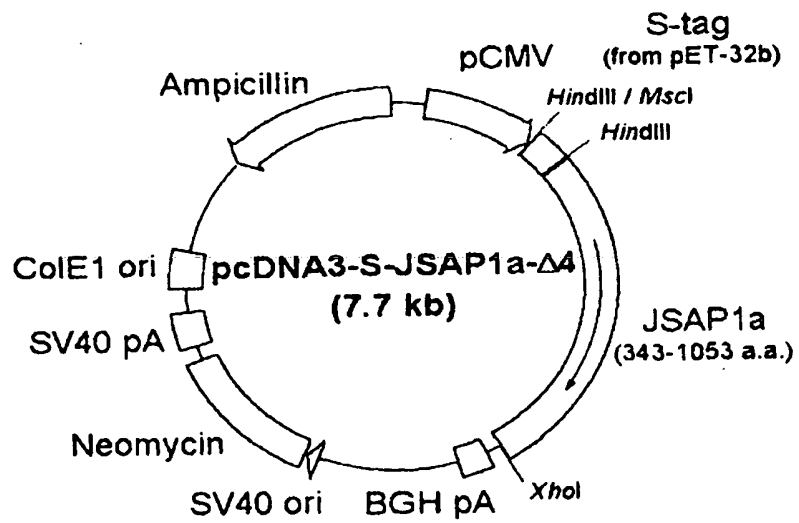
第 1 図



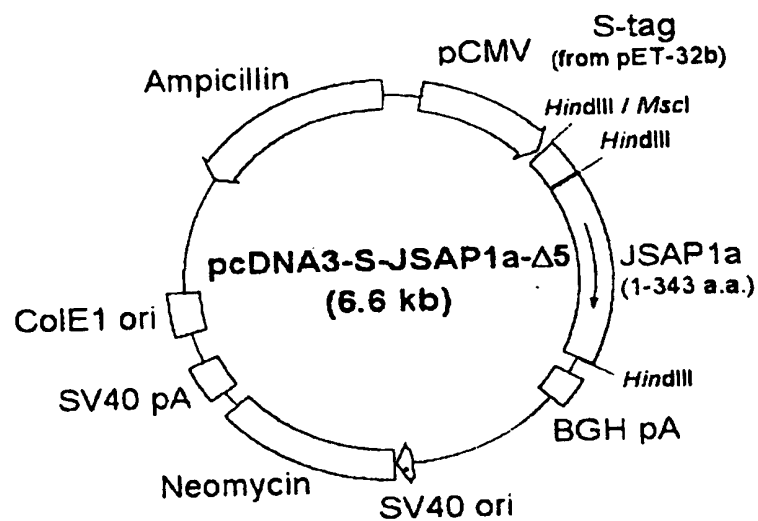
第 2 図



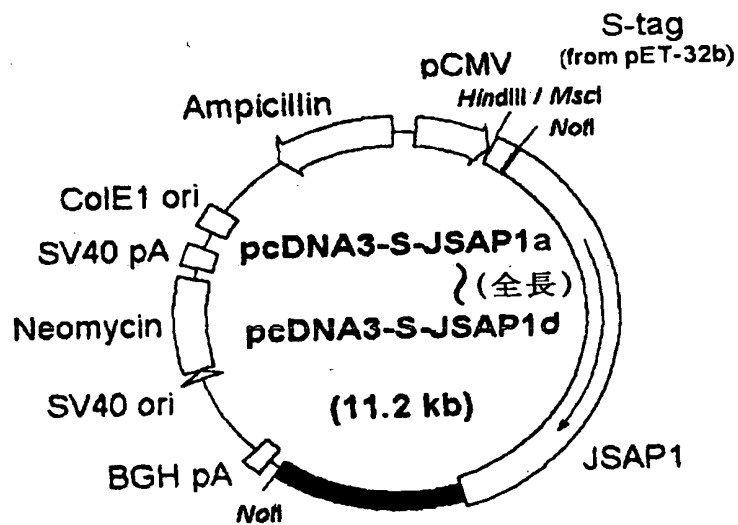
第 3 图



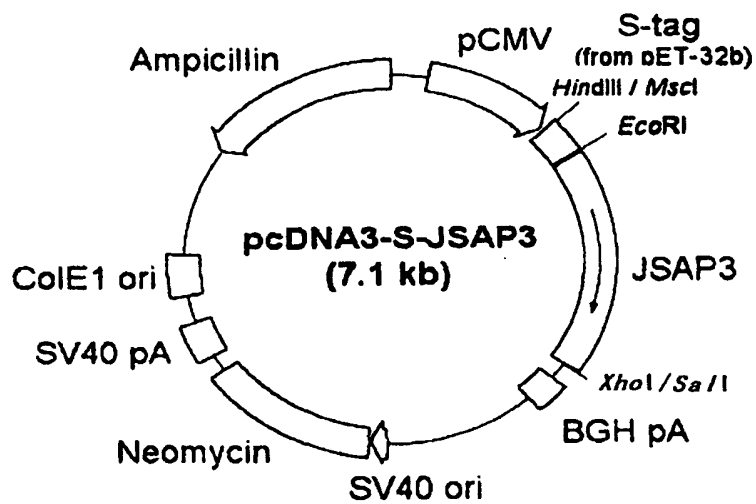
第 4 图



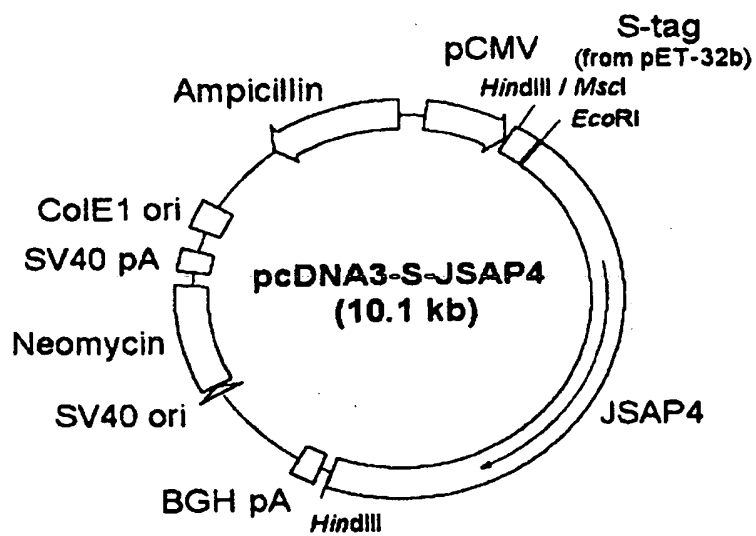
第 5 図



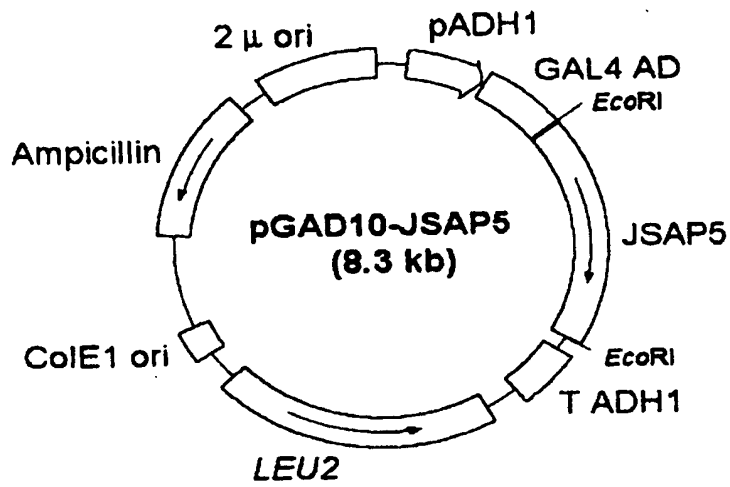
第 6 図



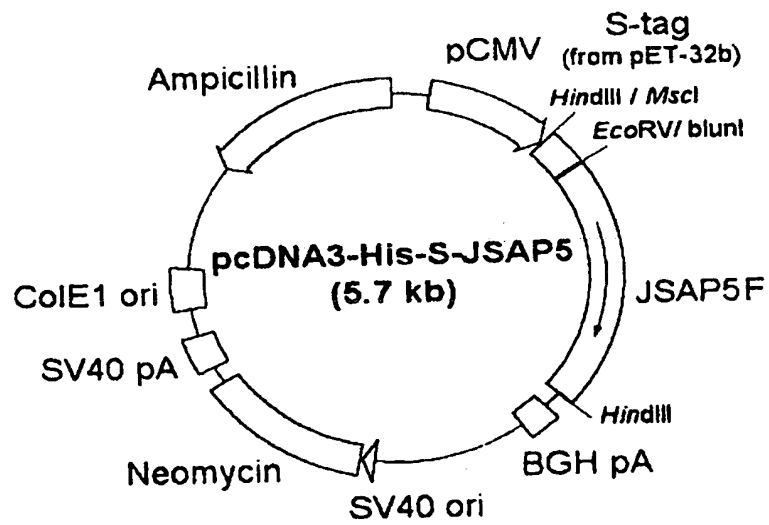
第 7 図



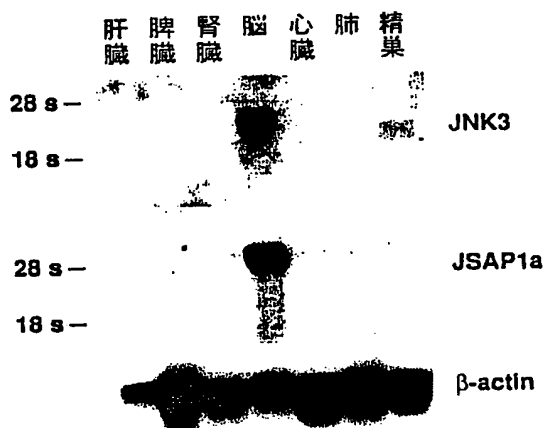
第 8 図



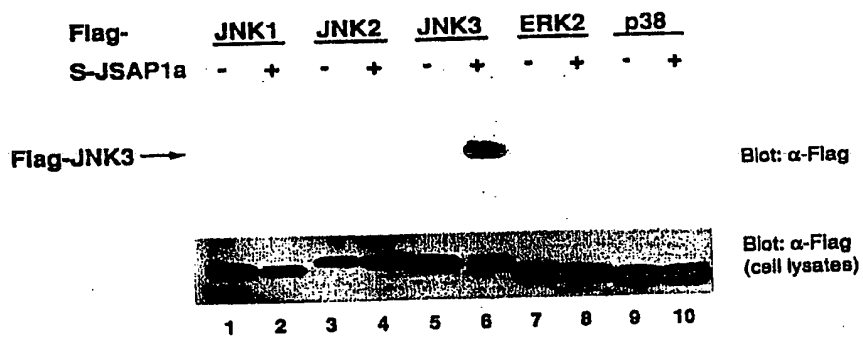
第 9 图



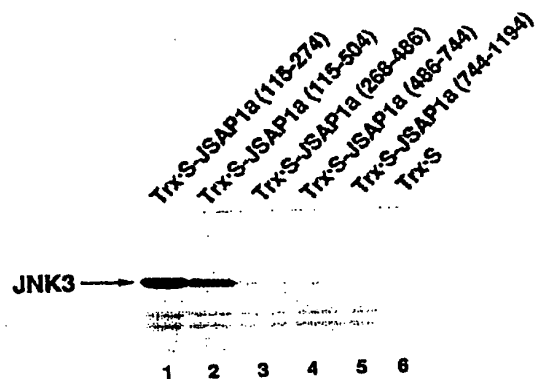
第 10 图



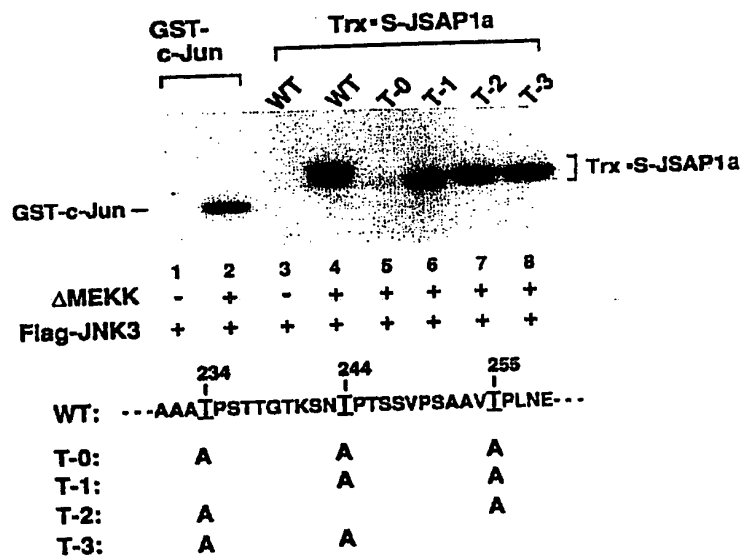
第 11 図



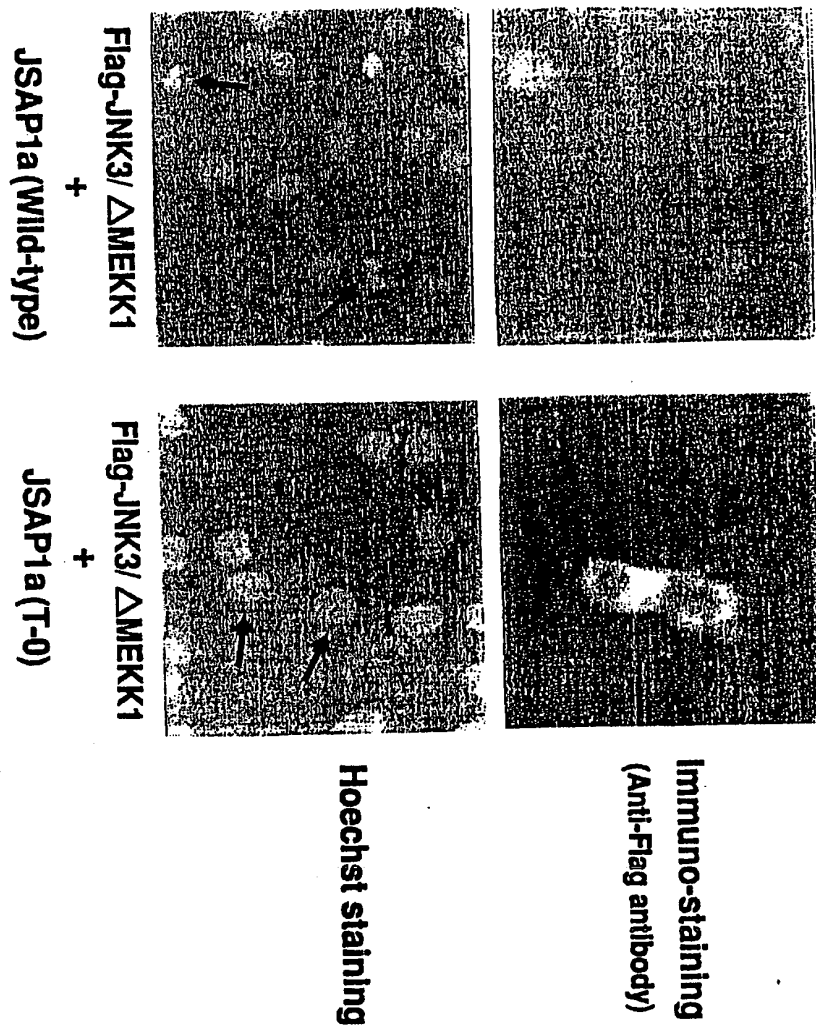
第 12 図



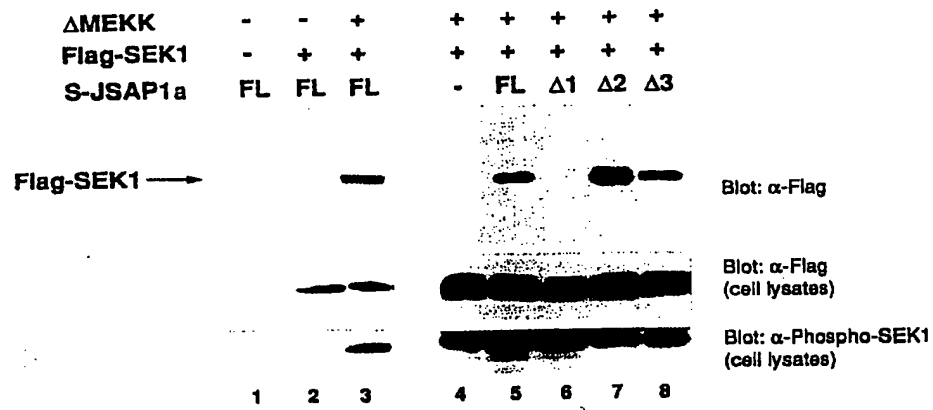
第 13 図



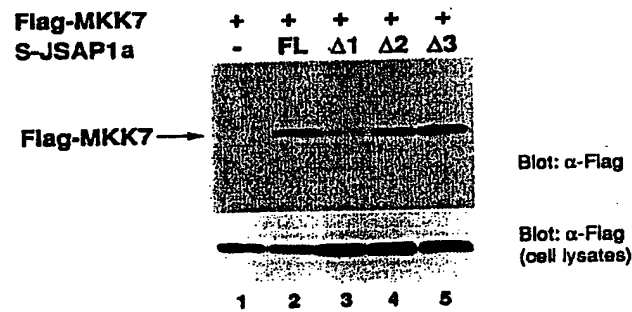
第 14 図



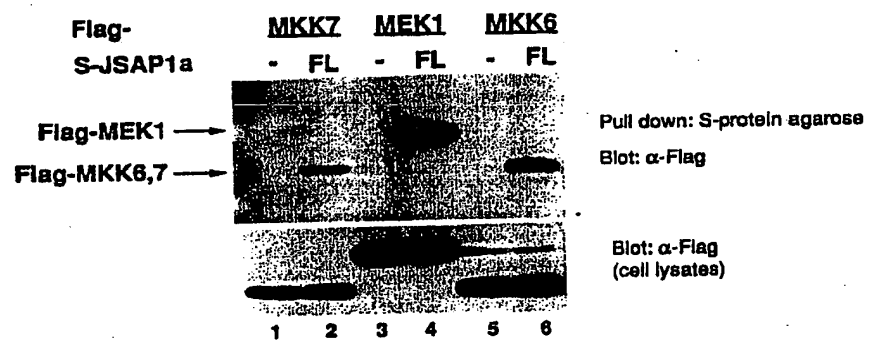
第 15 図



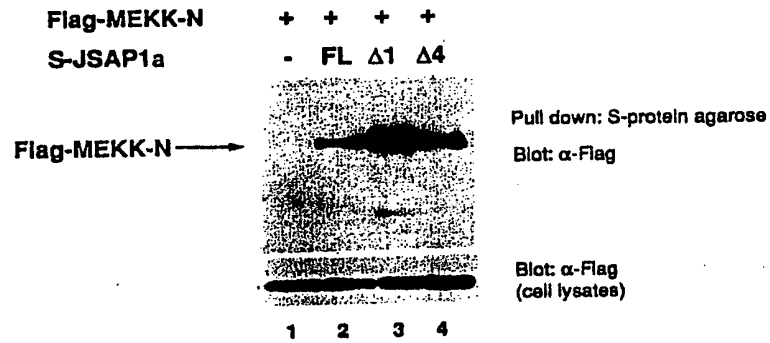
第 16 図



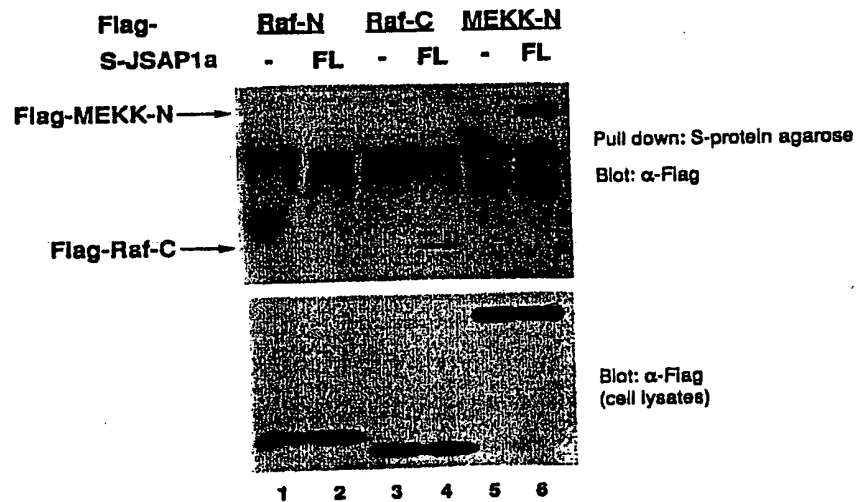
第 17 図



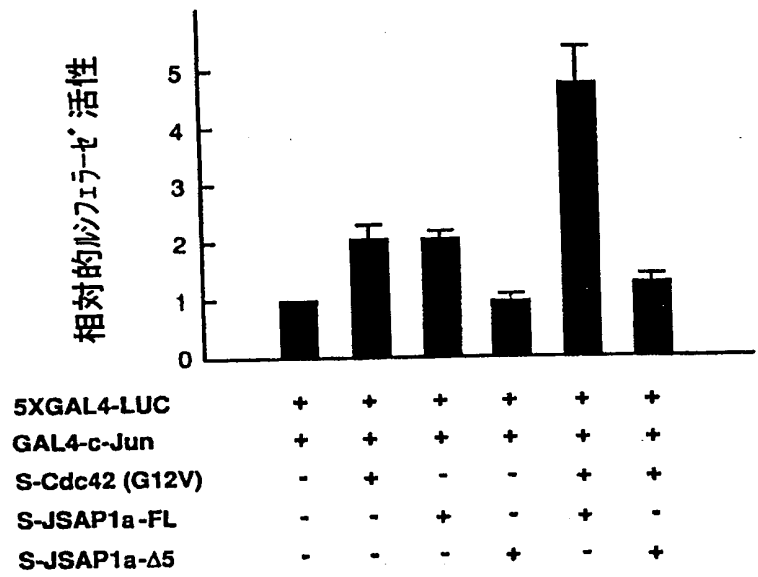
第 18 図



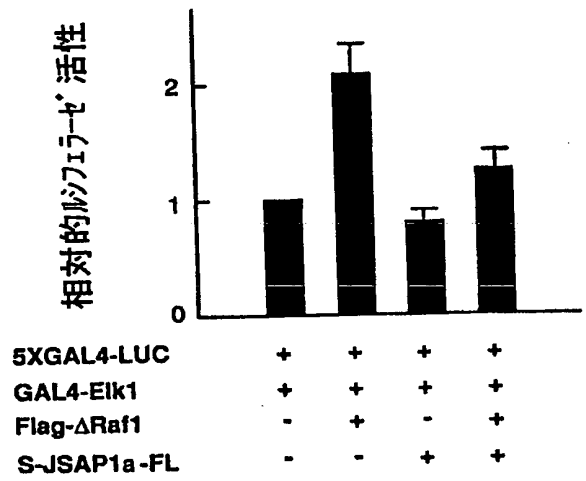
第 19 図



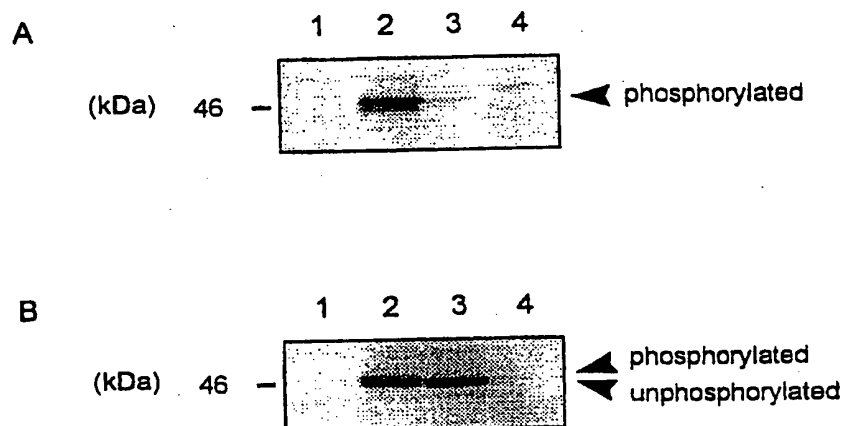
第 20 図



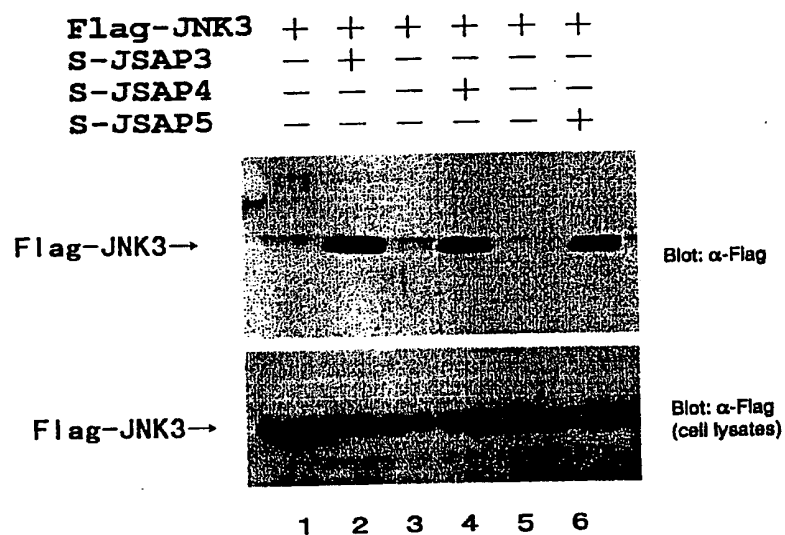
第 21 図



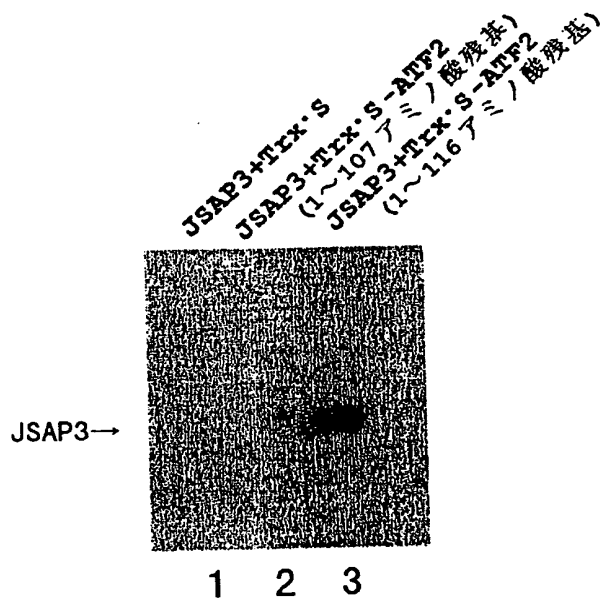
第 22 図



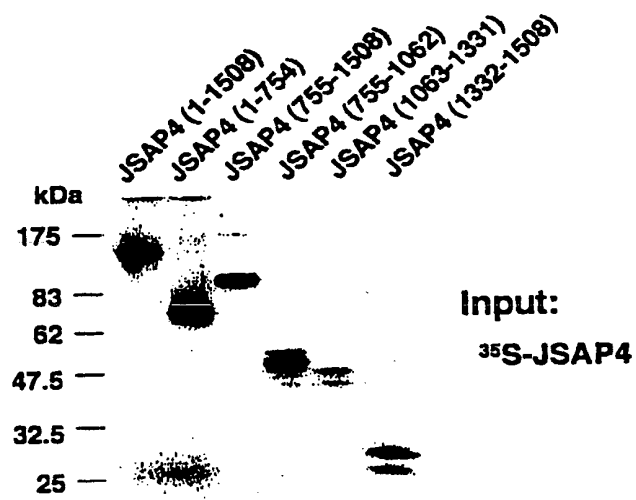
第 23 図



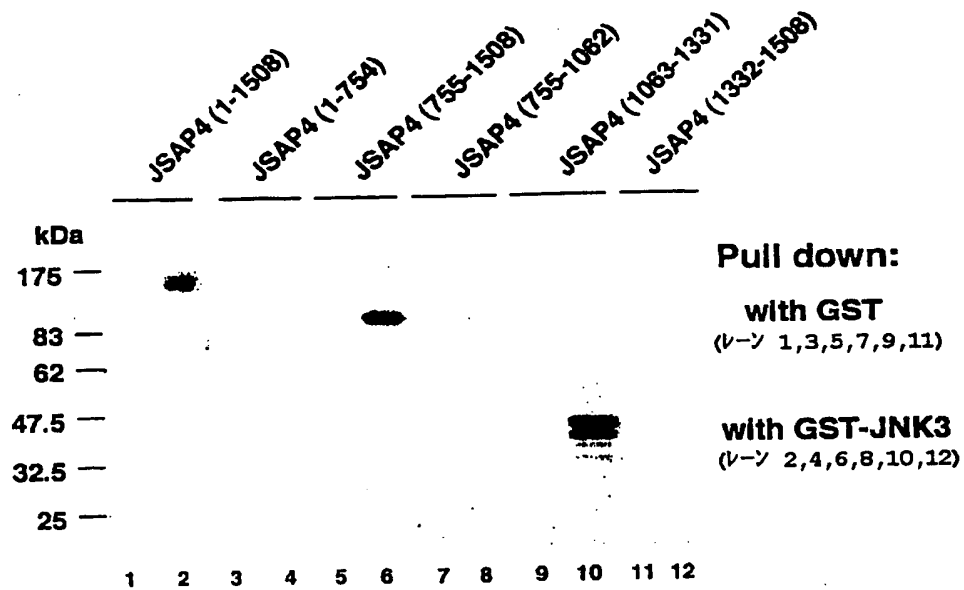
第 24 図



第 25 図

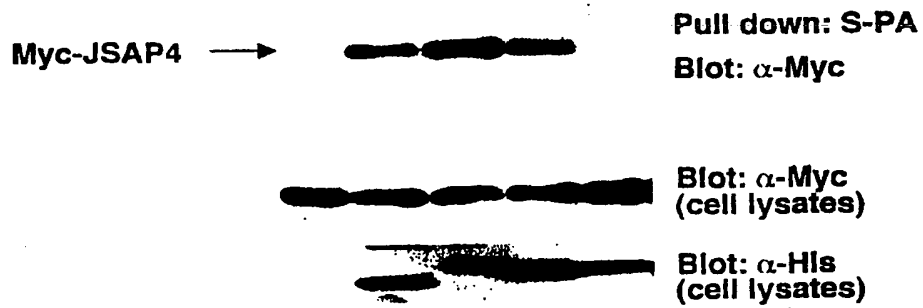


第 26 図

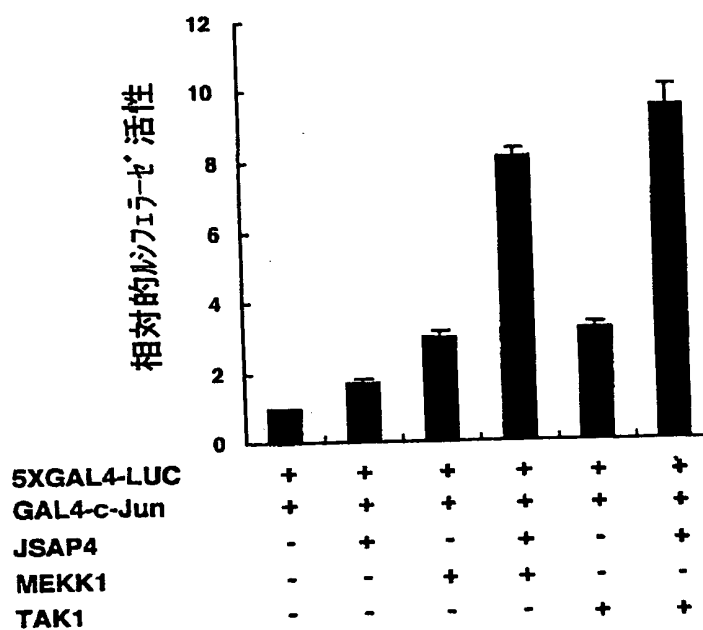


第 27 図

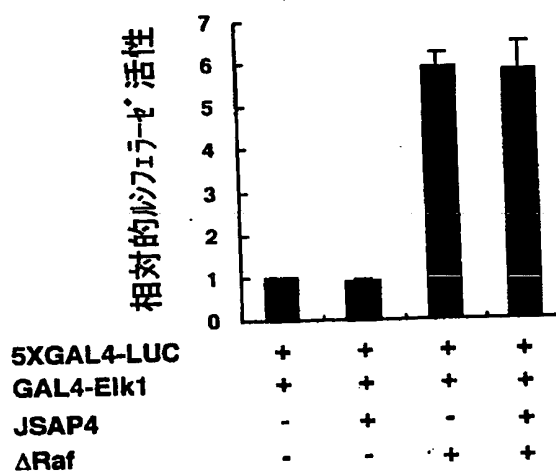
Myc-JSAP4	+	+	+	+	+
His-S-JNK1	-	+	-	-	-
His-S-JNK2	-	-	+	-	-
His-S-JNK3	-	-	-	+	-
His-S-ERK2	-	-	-	-	+



第 28 図



第 30 図



第 31 図

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,

<120> NOVEL POLYPEPTIDE

<130> 11169

<140>

<141>

<150> H10-332484

<151> 1998-11-24

<150> H11-248442

<151> 1999-09-02

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4173

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4021)

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.,

<120> NOVEL POLYPEPTIDE

<130> 11169

<140>

<141>

<150> H10-332484

<151> 1998-11-24

<150> H11-248442

<151> 1999-09-02

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 4173

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4021)

<400> 1

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtggat 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggccggcgta gccgcg atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163

Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr

5

10

15

tgc tcg ggc tcg gtc atg tcg gag cgt gtg tcg ggc ctg gcg ggc tcc 211

Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser

20

25

30

35

atc tac cgc gag ttc gag cgc ctc att cac tgc tat gac gag gag gtg 259

Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp Glu Glu Val

40

45

50

gtc aag gag ctc atg ccg ctg gtg gtg aac gtg ctg gag aac ctt gac 307

Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu Asn Leu Asp

55

60

65

tcg gtg ctg agc gag aac cag gag cac gag gtg gag ctg gag ctc cta 355

Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu Glu Leu Leu

70

75

80

cgc gag gac aac gag cag ctg ctc acg caa tac gag cgc gag aag gcg 403
Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala
85 90 95

ctg cgc aaa cag gcc gag gag aaa ttc atc gaa ttt gaa gat gcc ttg 451
Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ala Leu
100 105 110 115

gaa caa gag aag aaa gaa ctc cag atc cag gta gaa cat tat gag ttt 499
Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His Tyr Glu Phe
120 125 130

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547
Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile
135 140 145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595
Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala
150 155 160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643
Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile
165 170 175

gaa gtg ggg aac ctg ctg ctg gag aac tca cag ctt cta gag aca aaa 1315
Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys

390

395

400

aat gct tta aat gta gtg aag aat gac ctc att gct aag gtt gac caa 1363
Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln

405

410

415

ctg tca gga gaa cag gag gtc ctg aag ggt gag ctg gaa gca gcc aag 1411
Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys

420

425

430

435

caa gcg aaa gtc aag ctg gag aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa 1459
Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu

440

445

450

ctg aag aga gtc aag tca gag gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga 1507
Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg

455

460

465

gaa gag gtg gag gat gta agc agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa 1555
Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys

470

475

480

atc ccc atg gcc cag cgc cga cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga 1603
Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg

485

490

495

gtg ctc atg gaa cgc aac cag tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag 1651
Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln
500 505 510 515

gag gct gtg agg tgg act gaa atg atc aga gca tca agg gaa cac cca 1699
Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro
520 525 530

tct gtc cag gag aag aag aag tcc acc atc tgg cag ttc ttt agt cgc 1747
Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg
535 540 545

ctc ttc agc tcc tca tct agc ccc cct ccg gcc aaa cga tcc tac cca 1795
Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro
550 555 560

tct gtg aac att cac tac aag tca ccc act gca gct ggc ttt agc cag 1843
Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln
565 570 575

cgt cgc agc cat gct ttg tgc cag atc tca gcc ggc agc agg ccc ctg 1891
Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu
580 585 590 595

695 700 705

acc tgt gac cgg gaa gga gaa ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca 2275
Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser
710 715 720

cct gag aag aag aag gca aag gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc 2323
Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser
725 730 735

agt cgg gta tgg atc ctc acc agc acc ctg aca acc agc aag gtg gtg 2371
Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val
740 745 750 755

atc att gat gcc aac cag cca ggc aca att gtg gat cag ttc aca gtc 2419
Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val
760 765 770

tgc aat gcc cac gtc ctg tgt atc tcc agc att cct gcg gcc agt gac 2467
Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp
775 780 785

agt gac tat ccc cct ggg gag atg ttc cta gac agt gat gtg aac cct 2515
Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro
790 795 800

gaa gat tca ggt gct gat ggt gtg ctg gct ggc atc acc ctg gtg ggg 2563
Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly
805 810 815

tgt gct acc cgc tgc aat gtt cca cgt agc aac tgt tcc tca cga gga 2611
Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly
820 825 830 835

gac acc cca gta ctg gac aag ggg cag ggg gat gtg gcg acc act gcc 2659
Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala
840 845 850

aat ggg aag gtc aac ccg tcc caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc 2707
Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala
855 860 865

aca gag gtg cca gac cct ggt ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc 2755
Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val
870 875 880

cgg ccc ggg cct ctc aca gag cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc 2803
Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr
885 890 895

cca tcc tcc agc acc cag cct gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat 2851
Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn

900 905 910 915
ggc acc att gta cag cct cag gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca 2899
Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr
920 925 930
aca acc agt agc gct gca ccc act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc 2947
Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly
935 940 945
tgg ctc tat gtg cat tca gcg gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac 2995
Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His
950 955 960
tcc atc aag cta aaa gac tct gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc 3043
Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly
965 970 975
cga gtg ctg gta gct ctt gca gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt 3091
Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg
980 985 990 995
gga gag gat ggc cag tgg gac ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg 3139
Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu
1000 1005 1010

ggc cac cca cac cac tcc atc cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga 3187
Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg

1015

1020

1025

gtt tgg tgt ggc tac aag aac aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca 3235
Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr

1030

1035

1040

atg cag att gag aaa tca ttt gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag 3283
Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln

1045

1050

1055

gta cgt cag ctg gcc tgg atc ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc 3331
Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg

1060

1065

1070

1075

ttg gat tct acc ctt cgg ctc tac cat gct cac acc cac cag cac ctg 3379
Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu

1080

1085

1090

cag gat gtg gac att gag ccc tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc 3427
Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly

1095

1100

1105

aag ctg ggc ttc tcc ttc gtg cgc atc aca gcc tta ctc att gca ggc 3475
Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly

gcc act ctc aat ggc agt gtg cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg 3811
Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly
1220 1225 1230 1235

cct gct gca ccc gct gca gat gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca 3859
Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala
1240 1245 1250

ctg gtg ctg agt ggt ggt gaa ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac 3907
Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp
1255 1260 1265

gga gag gat gat gaa act gag gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca 3955
Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr
1270 1275 1280

aag ccc tcg ttg tcc aag gct gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag 4003
Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln
1285 1290 1295

gtg tcc tac acc cct gag tgagaccctg tcctacctga tgccaactgt 4051
Val Ser Tyr Thr Pro Glu
1300 1305

acataggacc ctacctgcct gcctccccgc ctgttcctg gggcagccag gttcgtccat 4111

cccccttttaa cctctcaact tgcagctttt gcctgaggtc cagcccctag ctgttagaga 4171

gg

4173

<210> 2

<211> 4200

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4045)

<400> 2

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtggat 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggcggcggta gccgcg atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163

Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr

5

10

15

tgc tcg ggc tcg gtc atg tcg gag cgt gtg tcg ggc ctg gcg ggc tcc 211

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547
Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile
135 140 145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595
Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala
150 155 160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643
Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile
165 170 175

gaa aga tcc aag atg cag caa gtt ggg ggt agc ggc caa aca gaa agc 691
Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln Thr Glu Ser
180 185 190 195

agc ctg ccc ggg cgg agt cct cgc cag tcg tgg agg aaa agc agg aag 739
Ser Leu Pro Gly Arg Ser Pro Arg Gln Ser Trp Arg Lys Ser Arg Lys
200 205 210

gag cgt ccc acc tct ctg aat gtc ttc ccc ctg gct gat ggc atg tgt 787
Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Cys
215 220 225

cca aac gat gag atg tct gag tca ggc cag tcc tca gca gct gca aca 835

Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr
230 235 240

ccc agt acc aca ggt acc aag tcc aac aca ccc acg tcc tcc gtg ccc 883
Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro
245 250 255

tca gca gca gtc acg cca ctc aac gag agc cta cag ccc ctg ggg gac 931
Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp
260 265 270 275

tat gtc agt gtc aca aag aac aac aag cag gcc cga gag aag cgc aat 979
Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn
280 285 290

agc cgt aac atg gag gtc cag gtc acc caa gag atg cgg aac gtc agt 1027
Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr Gln Glu Met Arg Asn Val Ser
295 300 305

atc ggc atg ggc agc agt gac gag tgg tcc gat gtt cag gac att atc 1075
Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile
310 315 320

gac tcc acc cca gag ctg gat gtg tgt cct gaa acc cgt ctg gag cgc 1123
Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg
325 330 335

Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu

440

445

450

aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa ctg aag aga gtc aag tca gag 1507

Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu

455

460

465

gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga gaa gag gtg gag gat gta agc 1555

Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser

470

475

480

agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa atc ccc atg gcc cag cgc cga 1603

Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg

485

490

495

cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga gtg ctc atg gaa cgc aac cag 1651

Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln

500

505

510

515

tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag gag gct gtg agg tgg act gaa 1699

Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu

520

525

530

atg atc aga gca tca agg gaa cac cca tct gtc cag gag aag aag aag 1747

Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys

535

540

545

Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu

440

445

450

aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa ctg aag aga gtc aag tca gag 1507

Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu

455

460

465

gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga gaa gag gtg gag gat gta agc 1555

Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser

470

475

480

agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa atc ccc atg gcc cag cgc cga 1603

Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg

485

490

495

cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga gtg ctc atg gaa cgc aac cag 1651

Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln

500

505

510

515

tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag gag gct gtg agg tgg act gaa 1699

Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu

520

525

530

atg atc aga gca tca agg gaa cac cca tct gtc cag gag aag aag aag 1747

Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys

535

540

545

Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln

645

650

655

gaa gac acc cgg atg aaa aat gtg cct gtc cct gtg tac tgt cgc cct 2131

Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro

660

665

670

675

ctg gtg gag aag gac cct tcg aca aag ctg tgg tgt gct gct ggt gtc 2179

Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val

680

685

690

aac ctg agt ggg tgg aag cca cat gaa gag gac tct agc aat gga ccc 2227

Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro

695

700

705

aag cct gta cca ggt cga gac cct ctg acc tgt gac cgg gaa gga gaa 2275

Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu

710

715

720

ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca cct gag aag aag aag gca aag 2323

Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys

725

730

735

gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc agt cgg gta tgg atc ctc acc 2371

Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr

740

745

750

755

Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser

855 860 865

caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc aca gag gtg cca gac cct ggt 2755

Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly

870 875 880

ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc cgg ccc ggg cct ctc aca gag 2803

Pro-Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu

885 890 895

cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc cca tcc tcc agc acc cag cct 2851

His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro

900 905 910 915

gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat ggc acc att gta cag cct cag 2899

Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln

920 925 930

gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca aca acc agt agc gct gca ccc 2947

Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro

935 940 945

act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc tgg ctc tat gtg cat tca gcg 2995

Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Val His Ser Ala

950 955 960

gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac tcc atc aag cta aaa gac tct 3043
Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser
965 970 975

gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc cga gtg ctg gta gct ctt gca 3091
Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala
980 985 990 995

gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt gga gag gat ggc cag tgg gac 3139
Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp
1000 1005 1010

ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg ggc cac cca cac cac tcc atc 3187
Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile
1015 1020 1025

cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga gtt tgg tgt ggc tac aag aac 3235
Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn
1030 1035 1040

aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca atg cag att gag aaa tca ttt 3283
Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe
1045 1050 1055

gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag gta cgt cag ctg gcc tgg atc 3331

Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile
 1060 1065 1070 1075

ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc ttg gat tct acc ctt cgg ctc 3379
 Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu
 1080 1085 1090

tac cat gct cac acc cac cag cac ctg cag gat gtg gac att gag ccc 3427
 Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro
 1095 1100 1105

tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc aag ctg ggc ttc tcc ttc gtg 3475
 Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val
 1110 1115 1120

cgc atc aca gcc tta ctc att gca ggc aac cgt ctg tgg gtg ggc act 3523
 Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr
 1125 1130 1135

ggc aat ggg gtt gtc atc tcc atc ccc ttg act gag act gtg gtc ctg 3571
 Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro Leu Thr Glu Thr Val Val Leu
 1140 1145 1150 1155

cat cga ggc cag ctc cta ggg ctc cga gcc aac aag aca tcc cca aca 3619
 His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr
 1160 1165 1170

tct ggg gag ggg acc cgc cca ggg ggc atc atc cat gtg tat ggg gac 3667
Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly Ile Ile His Val Tyr Gly Asp
1175 1180 1185

gac agc agt gac aag gcc gcc agt agt ttc atc ccc tac tgc tcc atg 3715
Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met
1190 1195 1200

gca cag gct cag ctt tgc ttc cat ggg cac cgt gat gct gtc aaa ttc 3763
Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly His Arg Asp Ala Val Lys Phe
1205 1210 1215

ttt gtc tct gtg cca gga aat gtg ctg gcc act ctc aat ggc agt gtg 3811
Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val
1220 1225 1230 1235

cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg cct gct gca ccc gct gca gat 3859
Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp
1240 1245 1250

gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca ctg gtg ctg agt ggt ggt gaa 3907
Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu
1255 1260 1265

ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac gga gag gat gat gaa act gag 3955

Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu
1270 1275 1280

gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca aag ccc tgc ttg tcc aag gct 4003
Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala
1285 1290 1295

gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag gtg tcc tac acc cct gag 4043
Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln Val Ser Tyr Thr Pro Glu
1300 1305 1310

tgagaccctg tcctacctga tgccaactgt acataggacc ctacctgcct gcctccccgc 4102

ctgttccttg gggcagccag gttcgtccat ccccttttaa cctctcaact tgcagctttt 4162

gcctgaggtc cagcccctag ctgttagaga gg 4200

<210> 3

<211> 4269

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4117)

<400> 3

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtagg 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggcggcggta gccgag atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163

Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr

5

10

15

tgc tcg ggc tcg gtc atg tcg gag cgt gtg tcg ggc ctg gcg ggc tcc 211

Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser

20

25

30

35

atc tac cgc gag ttc gag cgc ctc att cac tgc tat gac gag gag gtg 259

Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp Glu Glu Val

40

45

50

gtc aag gag ctc atg ccg ctg gtg gtg aac gtg ctg gag aac ctt gag 307

Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu Asn Leu Asp

55

60

65

tcg gtg ctg agc gag aac cag gag cac gag gtg gag ctg gag ctc cta 355

Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu Glu Leu Leu

70

75

80

cgc gag gac aac gag cag ctg ctc acg caa tac gag cgc gag aag gcg 403
Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala
85 90 95

ctg cgc aaa cag gcc gag gag aaa ttc atc gaa ttt gaa gat gcc ttg 451
Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ala Leu
100 105 110 115

gaa caa gag aag aaa gaa ctc cag atc cag gta gaa cat tat gag ttt 499
Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His Tyr Glu Phe
120 125 130

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547
Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile
135 140 145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595
Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala
150 155 160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643
Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile
165 170 175

gaa aga tcc aag atg cag caa gtt ggg ggt agc ggc caa aca gaa agc 691
Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln Thr Glu Ser
180 185 190 195

agc ctg ccc ggg cgg agc agg aag gag cgt ccc acc tct ctg aat gtc 739
Ser Leu Pro Gly Arg Ser Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val
200 205 210

ttc ccc ctg gct gat ggc atg gta cgt gca cag atg ggg ggc aag ctc 787
Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly Gly Lys Leu
215 220 225

gtg cct gcg ggg gac cac tgg cac ctg agt gac ctc ggc cag cta cag 835
Val Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly Gln Leu Gln
230 235 240

tcc agc tcc agc tac cag tgt cca aac gat gag atg tct gag tca ggc 883
Ser Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly
245 250 255

cag tcc tca gca gct gca aca ccc agt acc aca ggt acc aag tcc aac 931
Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn
260 265 270 275

aca ccc acg tcc tcc gtg ccc tca gca gca gtc acg cca ctc aac gag 979
Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu

280	285	290	
agc cta cag ccc ctg ggg gac tat gtc agt gtc aca aag aac aac aag 1027			
Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys			
295	300	305	
cag gcc cga gag aag cgc aat agc cgt aac atg gag gtc cag gtc acc 1075			
Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr			
310	315	320	
caa gag atg cgg aac gtc agt atc ggc atg ggc agc agt gac gag tgg 1123			
Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp			
325	330	335	
tcc gat gtt cag gac att atc gac tcc acc cca gag ctg gat gtg tgt 1171			
Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys			
340	345	350	355
cct gaa acc cgt ctg gag cgc aca gga agc agc cca acc cag gga att 1219			
Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln Gly Ile			
360	365	370	
gta aac aaa gct ttt gga atc aac act gac tcc ttg tat cac gaa ctc 1267			
Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His Glu Leu			
375	380	385	

tcc acg gcg gga tct gag gtc atc ggg gat gtg gac gag gga gct gat 1315
Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly Ala Asp
390 395 400

ctc cta ggg gag ttt tca gtg cgc gat gat ttt ttt gga atg ggc aaa 1363
Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met Gly Lys
405 410 415

gaa gtg ggg aac ctg ctg ctg gag aac tca cag ctt cta gag aca aaa 1411
Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys
420 425 430 435

aat gct tta aat gta gtg aag aat gac ctc att gct aag gtt gac caa 1459
Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln
440 445 450

ctg tca gga gaa cag gag gtc ctg aag ggt gag ctg gaa gca gcc aag 1507
Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys
455 460 465

caa gcg aaa gtc aag ctg gag aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa 1555
Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu
470 475 480

ctg aag aga gtc aag tca gag gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga 1603
Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg

485	490	495	
gaa gag gtg gag gat gta agc agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa 1651			
Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys			
500	505	510	515
atc ccc atg gcc cag cgc cga cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga 1699			
Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg			
	520	525	530
gtg ctc atg gaa cgc aac cag tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag 1747			
Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln			
	535	540	545
gag gct gtg agg tgg act gaa atg atc aga gca tca agg gaa cac cca 1795			
Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro			
	550	555	560
tct gtc cag gag aag aag aag tcc acc atc tgg cag ttc ttt agt cgc 1843			
Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg			
	565	570	575
ctc ttc agc tcc tca tct agc ccc cct ccg gcc aaa cga tcc tac cca 1891			
Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro			
580	585	590	595

tct gtg aac att cac tac aag tca ccc act gca gct ggc ttt agc cag 1939
Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln
600 605 610

cgt cgc agc cat gct ttg tgc cag atc tca gcc ggc agc agg ccc ctg 1987
Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu
615 620 625

gag ttc ttc cct gat gat gac tgc acc tct tct gcc cgg cgg gag cag 2035
Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln
630 635 640

aag cgg gag cag tac cgc cag gtt cgt gaa cac gtg cgc aat gat gac 2083
Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp
645 650 655

ggg agg ctg cag gcc tgt ggg tgg agc ctg cct gcc aag tac aag cag 2131
Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln
660 665 670 675

ctg agc ccc aat gga ggc cag gaa gac acc cgg atg aaa aat gtg cct 2179
Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro
680 685 690

gtc cct gtg tac tgt cgc cct ctg gtg gag aag gac cct tcg aca aag 2227
Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys

695	700	705	
ctg tgg tgt gct gct ggt gtc aac ctg agt ggg tgg aag cca cat gaa	2275		
Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu			
710	715	720	
gag gac tct agc aat gga ccc aag cct gta cca ggt cga gac cct ctg	2323		
Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu			
725	730	735	
acc tgt gac cgg gaa gga gaa ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca	2371		
Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser			
740	745	750	755
cct gag aag aag aag gca aag gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc	2419		
Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser			
760	765	770	
agt cgg gta tgg atc ctc acc agc acc ctg aca acc agc aag gtg gtg	2467		
Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val			
775	780	785	
atc att gat gcc aac cag cca ggc aca att gtg gat cag ttc aca gtc	2515		
Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val			
790	795	800	

tgc aat gcc cac gtc ctg tgt atc tcc agc att cct gcg gcc agt gac 2563
Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp
805 810 815

agt gac tat ccc cct ggg gag atg ttc cta gac agt gat gtg aac cct 2611
Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro
820 825 830 835

gaa gat tca ggt gct gat ggt gtg ctg gct ggc atc acc ctg gtg ggg 2659
Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly
840 845 850

tgt gct acc cgc tgc aat gtt cca cgt agc aac tgt tcc tca cga gga 2707
Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly
855 860 865

gac acc cca gta ctg gac aag ggg cag ggg gat gtg gcg acc act gcc 2755
Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala
870 875 880

aat ggg aag gtc aac ccg tcc caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc 2803
Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala
885 890 895

aca gag gtg cca gac cct ggt ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc 2851
Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val

900 905 910 915
cgg ccc ggg cct ctc aca gag cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc 2899
Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr
920 925 930
cca tcc tcc agc acc cag cct gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat 2947
Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn
935 940 945
ggc acc att gta cag cct cag gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca 2995
Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr
950 955 960
aca acc agt agc gct gca ccc act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc 3043
Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly
965 970 975
tgg ctc tat gtg cat tca gcg gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac 3091
Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His
980 985 990 995
tcc atc aag cta aaa gac tct gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc 3139
Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly
1000 1005 1010

cga gtg ctg gta gct ctt gca gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt 3187
Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg

1015

1020

1025

gga gag gat ggc cag tgg gac ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg 3235
Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu

1030

1035

1040

ggc cac cca cac cac tcc atc cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga 3283
Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg

1045

1050

1055

gtt tgg tgt ggc tac aag aac aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca 3331
Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr

1060

1065

1070

1075

atg cag att gag aaa tca ttt gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag 3379
Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln

1080

1085

1090

gta cgt cag ctg gcc tgg atc ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc 3427
Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg

1095

1100

1105

ttg gat tct acc ctt cgg ctc tac cat gct cac acc cac cag cac ctg 3475
Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu

1110	1115	1120	
cag gat gtg gac att gag ccc tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc 3523			
Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly			
1125	1130	1135	
aag ctg ggc ttc tcc ttc gtg cgc atc aca gcc tta ctc att gca ggc 3571			
Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly			
1140	1145	1150	1155
aac cgt ctg tgg gtg ggc act ggc aat ggg gtt gtc atc tcc atc ccc 3619			
Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro			
1160	1165	1170	
ttg act gag act gtg gtc ctg cat cga ggc cag ctc cta ggg ctc cga 3667			
Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg			
1175	1180	1185	
gcc aac aag aca tcc cca aca tct ggg gag ggg acc cgc cca ggg ggc 3715			
Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly			
1190	1195	1200	
atc atc cat gtg tat ggg gac gac agc agt gac aag gcc gcc agt agt 3763			
Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser			
1205	1210	1215	

ttc atc ccc tac tgc tcc atg gca cag gct cag ctt tgc ttc cat ggg 3811
Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly
1220 1225 1230 1235

cac cgt gat gct gtc aaa ttc ttt gtc tct gtg cca gga aat gtg ctg 3859
His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu
1240 1245 1250

gcc act ctc aat ggc agt gtg cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg 3907
Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly
1255 1260 1265

cct gct gca ccc gct gca gat gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca 3955
Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala
1270 1275 1280

ctg gtg ctg agt ggt ggt gaa ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac 4003
Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp
1285 1290 1295

gga gag gat gat gaa act gag gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca 4051
Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr
1300 1305 1310 1315

aag ccc tcg ttg tcc aag gct gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag 4099
Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln

1320

1325

1330

gtg tcc tac acc cct gag tgagaccctg tcctacctga tgccaactgt 4147

Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1335

acataggacc ctacctgcct gcctccccgc ctgttccttg gggcagccag gttcgtccat 4207

cccccttttaa cctctcaact tgcagctttt gcctgaggtc cagcccctag ctgtagaga 4267

gg

4269

<210> 4

<211> 4266

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (107)..(4114)

<400> 4

ggcctgggcg gcggcacatc ctaaggtagc ggctgcctga ggtgacagct gcccgtagat 60

tcgggccccg gaacgagccg cgctggcggc ggcggcggta gccgag atg atg gag 115

Met Met Glu

1

atc cag atg gac gag gga gga ggt gtg gtg gtg tac caa gac gac tac 163
Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln Asp Asp Tyr
5 10 15

tgc tgc ggc tgc gtc atg tgc gag cgt gtg tgc ggc ctg gcg ggc tcc 211
Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu Ala Gly Ser
20 25 30 35

atc tac cgc gag ttc gag cgc ctc att cac tgc tat gac gag gag gtg 259
Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp Glu Glu Val
40 45 50

gtc aag gag ctc atg ccg ctg gtg gtg aac gtg ctg gag aac ctt gac 307
Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu Asn Leu Asp
55 60 65

tcg gtg ctg agc gag aac cag gag cac gag gtg gag ctg gag ctc cta 355
Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu Glu Leu Leu
70 75 80

cgc gag gac aac gag cag ctg ctc acg caa tac gag cgc gag aag gcg 403
Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Lys Ala
85 90 95

ctg cgc aaa cag gcc gag gag aaa ttc atc gaa ttt gaa gat gcc ttg 451
Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu Asp Ala Leu
100 105 110 115

gaa caa gag aag aaa gaa ctc cag atc cag gta gaa cat tat gag ttt 499
Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His Tyr Glu Phe
120 125 130

cag aca cgc cag ctg gag cta aag gcc aaa aac tat gca gat cag att 547
Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala Asp Gln Ile
135 140 145

tcc cga ctg gag gaa cga gaa tcg gag atg aag aag gaa tac aat gcc 595
Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu Tyr Asn Ala
150 155 160

ctg cac cag cgg cac aca gag atg atc cag acc tat gtg gaa cac att 643
Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val Glu His Ile
165 170 175

gaa aga tcc aag atg cag caa gtt ggg ggt agc ggc caa aca gaa agc 691
Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln Thr Glu Ser
180 185 190 195

agc ctg ccc ggg cgg agg aag gag cgt ccc acc tct ctg aat gtc ttc 739

Ser.Leu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val Phe

200

205

210

ccc ctg gct gat ggc atg gta cgt gca cag atg ggg ggc aag ctc gtg 787

Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly Gly Lys Leu Val

215

220

225

cct gcg ggg gac cac tgg cac ctg agt gac ctc ggc cag cta cag tcc 835

Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly Gln Leu Gln Ser

230

235

240

agc tcc agc tac cag tgt cca aac gat gag atg tct gag tca ggc cag 883

Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly Gln

245

250

255

tcc tca gca gct gca aca ccc agt acc aca ggt acc aag tcc aac aca 931

Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn Thr

260

265

270

275

ccc acg tcc tcc gtg ccc tca gca gca gtc acg cca ctc aac gag agc 979

Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu Ser

280

285

290

cta cag ccc ctg ggg gac tat gtc agt gtc aca aag aac aac aag cag 1027

Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys Gln

295

300

305

gcc cga gag aag cgc aat agc cgt aac atg gag gtc cag gtc acc caa 1075
Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr Gln
310 315 320

gag atg cgg aac gtc agt atc ggc atg ggc agc agt gac gag tgg tcc 1123
Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp Glu Trp Ser
325 330 335

gat gtt cag gac att atc gac tcc acc cca gag ctg gat gtg tgt cct 1171
Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp Val Cys Pro
340 345 350 355

gaa acc cgt ctg gag cgc aca gga agc agc cca acc cag gga att gta 1219
Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln Gly Ile Val
360 365 370

aac aaa gct ttt gga atc aac act gac tcc ttg tat cac gaa ctc tcc 1267
Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His Glu Leu Ser
375 380 385

acg gcg gga tct gag gtc atc ggg gat gtg gac gag gga gct gat ctc 1315
Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly Ala Asp Leu
390 395 400

cta ggg gag ttt tca gtg cgc gat gat ttt ttt gga atg ggc aaa gaa 1363

Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met Gly Lys Glu

405

410

415

gtg ggg aac ctg ctg ctg gag aac tca cag ctt cta gag aca aaa aat 1411

Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu Thr Lys Asn

420

425

430

435

gct tta aat gta gtg aag aat gac ctc att gct aag gtt gac caa ctg 1459

Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val Asp Gln Leu

440

445

450

tca gga gaa cag gag gtc ctg aag ggt gag ctg gaa gca gcc aag caa 1507

Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys Gln

455

460

465

gcg aaa gtc aag ctg gag aac cga atc aaa gag ctt gaa gaa gaa ctg 1555

Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu Leu

470

475

480

aag aga gtc aag tca gag gca gta act gcc cgc cgt gag ccc aga gaa 1603

Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg Glu

485

490

495

gag gtg gag gat gta agc agc tat ctc tgt aca gaa ttg gac aaa atc 1651

Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys Ile

500

505

510

515

ccc atg gcc cag cgc cga cgc ttc aca cgg gtg gag atg gcc cga gtg 1699

Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg Val

520

525

530

ctc atg gaa cgc aac cag tac aag gaa cgc ctc atg gag ctg cag gag 1747

Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln Glu

535

540

545

gct gtg agg tgg act gaa atg atc aga gca tca agg gaa cac cca tct 1795

Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro Ser

550

555

560

gtc cag gag aag aag aag tcc acc atc tgg cag ttc ttt agt cgc ctc 1843

Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg Leu

565

570

575

ttc agc tcc tca tct agc ccc cct ccg gcc aaa cga tcc tac cca tct 1891

Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro Ser

580

585

590

595

gtg aac att cac tac aag tca ccc act gca gct ggc ttt agc cag cgt 1939

Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln Arg

600

605

610

cgc agc cat gct ttg tgc cag atc tca gcc ggc agc agg ccc ctg gag 1987

Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu Glu
 615 620 625

ttc ttc cct gat gat gac tgc acc tct tct gcc cgg cgg gag cag aag 2035
 Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln Lys
 630 635 640

cgg gag cag tac cgc cag gtt cgt gaa cac gtg cgc aat gat gac ggg 2083
 Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp Gly
 645 650 655

agg ctg cag gcc tgt ggg tgg agc ctg cct gcc aag tac aag cag ctg 2131
 Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln Leu
 660 665 670 675

agc ccc aat gga ggc cag gaa gac acc cgg atg aaa aat gtg cct gtc 2179
 Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro Val
 680 685 690

cct gtg tac tgt cgc cct ctg gtg gag aag gac cct tcg aca aag ctg 2227
 Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys Leu
 695 700 705

tgg tgt gct gct ggt gtc aac ctg agt ggg tgg aag cca cat gaa gag 2275
 Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu Glu
 710 715 720

gac tct agc aat gga ccc aag cct gta cca ggt cga gac cct ctg acc 2323
Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu Thr
725 730 735

tgt gac cgg gaa gga gaa ggc gaa ccc aag agc aca cac cca tca cct 2371
Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser Pro
740 745 750 755

gag aag aag aag gca aag gaa acc cct gag gca gat gct acc tcc agt 2419
Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser Ser
760 765 770

cgg gta tgg atc ctc acc agc acc ctg aca acc agc aag gtg gtg atc 2467
Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val Ile
775 780 785

att gat gcc aac cag cca ggc aca att gtg gat cag ttc aca gtc tgc 2515
Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val Cys
790 795 800

aat gcc cac gtc ctg tgt atc tcc agc att cct gcg gcc agt gac agt 2563
Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp Ser
805 810 815

gac tat ccc cct ggg gag atg ttc cta gac agt gat gtg aac cct gaa 2611

Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro Glu

820 825 830 835

gat tca ggt gct gat ggt gtg ctg gct ggc atc acc ctg gtg ggg tgt 2659

Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly Cys

840 845 850

gct acc cgc tgc aat gtt cca cgt agc aac tgt tcc tca cga gga gac 2707

Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly Asp

855 860 865

acc cca gta ctg gac aag ggg cag ggg gat gtg gcg acc act gcc aat 2755

Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala Asn

870 875 880

ggg aag gtc aac ccg tcc caa tcc aca gaa gaa gcc aca gaa gcc aca 2803

Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala Thr

885 890 895

gag gtg cca gac cct ggt ccc agc gag tca gaa gca acg aca gtc cgg 2851

Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val Arg

900 905 910 915

ccc ggg cct ctc aca gag cat gtc ttt act gac cca gca ccc acc cca 2899

Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr Pro

920 925 930

tcc tcc agc acc cag cct gcc agt gag aat ggg tca gaa tcc aat ggc 2947
Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn Gly
935 940 945

acc att gta cag cct cag gtg gag ccc agt ggg gaa ctc tca aca aca 2995
Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr Thr
950 955 960

acc agt agc gct gca ccc act atg tgg cta gga gcc cag aat ggc tgg 3043
Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly Trp
965 970 975

ctc tat gtg cat tca gcg gta gcc aac tgg aag aag tgt ctg cac tcc 3091
Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His Ser
980 985 990 995

atc aag cta aaa gac tct gtg ctg agc ctg gtg cat gtc aaa ggc cga 3139
Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly Arg
1000 1005 1010

gtg ctg gta gct ctt gca gat ggg acc ctg gct atc ttc cat cgt gga 3187
Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg Gly
1015 1020 1025

gag gat ggc cag tgg gac ctg agc aac tac cac cta atg gac ctg ggc 3235

Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu Gly
1030 1035 1040

cac cca cac cac tcc atc cgc tgc atg gct gtt gtg aat gac cga gtt 3283
His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg Val
1045 1050 1055

tgg tgt ggc tac aag aac aag gtg cat gtt atc cag ccc aag aca atg 3331
Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr Met
1060 1065 1070 1075

cag att gag aaa tca ttt gat gcc cac cca agg cgg gaa agc cag gta 3379
Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln Val
1080 1085 1090

cgt cag ctg gcc tgg atc ggt gat gga gtg tgg gtc tct att cgc ttg 3427
Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg Leu
1095 1100 1105

gat tct acc ctt cgg ctc tac cat gct cac acc cac cag cac ctg cag 3475
Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu Gln
1110 1115 1120

gat gtg gac att gag ccc tat gtt agc aag atg cta gga acc ggc aag 3523
Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly Lys
1125 1130 1135

Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Ala

1240

1245

1250

act ctc aat ggc agt gtg cta gac agc cca tca gag ggc cct ggg cct 3907

Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly Pro

1255

1260

1265

gct gca ccc gct gca gat gct gag ggc cag aag ttg aag aat gca ctg 3955

Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala Leu

1270

1275

1280

gtg ctg agt ggt ggt gaa ggt tac att gac ttc cgt atc gga gac gga 4003

Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp Gly

1285

1290

1295

gag gat gat gaa act gag gaa tgt gcc ggg gac gtg aac cag aca aag 4051

Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr Lys

1300

1305

1310

1315

ccc tcg ttg tcc aag gct gag cgc agc cac atc atc gtg tgg cag gtg 4099

Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln Val

1320

1325

1330

tcc tac acc cct gag tgagaccctg tcctacctga tgccaactgt acataggacc 4154

Ser Tyr Thr Pro Glu

1335

ctacctgcct gcctccccgc ctgttccttg gggcagccag gtctgtccat ccccttttaa 4214

cctctcaact tgcagctttt gcctgaggtc cagcccctag ctgttagaga gg 4266

<210> 5

<211> 1450

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (41)..(1330)

<400> 5

ggcgaattca tggctgtgga aaccccgccc caattaagca atg tca ggc gtc cga 55

Met Ser Gly Val Arg

1 5

cct ccc atc atg aac ggg ccc atg cac ccc cgg ccc ctg gtg gcg ctg 103

Pro Pro Ile Met Asn Gly Pro Met His Pro Arg Pro Leu Val Ala Leu

10 15 20

ctg gat ggc cgg gac tgc aca gtg gag atg cct atc ctg aag gat gtg 151

Leu Asp Gly Arg Asp Cys Thr Val Glu Met Pro Ile Leu Lys Asp Val

25 30 35

gcc aca gta gcc ttc tgt gat gca cag tcc aca cag gag atc cat gag 199
Ala Thr Val Ala Phe Cys Asp Ala Gln Ser Thr Gln Glu Ile His Glu

40 45 50

aag gta ctg aat gag gct gtg ggt gcc ctg atg tac cat acc atc aca 247
Lys Val Leu Asn Glu Ala Val Gly Ala Leu Met Tyr His Thr Ile Thr

55 60 65

ctg acc aga gaa gat ctg gag aag ttt aaa gct ctt aga atc atc gtc 295
Leu Thr Arg Glu Asp Leu Glu Lys Phe Lys Ala Leu Arg Ile Ile Val

70 75 80 85

cga att ggc agc ggg ttt gac aat atc gac atc aag tca gct ggg gat 343
Arg Ile Gly Ser Gly Phe Asp Asn Ile Asp Ile Lys Ser Ala Gly Asp

90 95 100

cta ggc atc gca gtg tgc aat gtg ccg gca gca tct gtg gaa gaa acg 391
Leu Gly Ile Ala Val Cys Asn Val Pro Ala Ala Ser Val Glu Glu Thr

105 110 115

gca gac tcc acc ctg tgc cac atc ctg aac ctg tac cga cga acc acc 439
Ala Asp Ser Thr Leu Cys His Ile Leu Asn Leu Tyr Arg Arg Thr Thr

120 125 130

tgg cta cac cag gcc ctt cgg gaa ggc act cga gtc cag agt gta gag 487

Trp Leu His Gln Ala Leu Arg Glu Gly Thr Arg Val Gln Ser Val Glu

135

140

145

cag atc cga gag gtg gct tca gga gct gcc agg atc cgt gga gag acc 535

Gln Ile Arg Glu Val Ala Ser Gly Ala Ala Arg Ile Arg Gly Glu Thr

150

155

160

165

ttg ggc atc att gga cta ggt cgt gtg ggc cag gcg gtg gca ctt cgg 583

Leu Gly Ile Ile Gly Leu Gly Arg Val Gly Gln Ala Val Ala Leu Arg

170

175

180

gca aag gct ttt ggc ttc aac gtc ctc ttc tat gat cca tac cta tct 631

Ala Lys Ala Phe Gly Phe Asn Val Leu Phe Tyr Asp Pro Tyr Leu Ser

185

190

195

gat gga atc gag cgg gcc ctg ggg cta cag cgc gtg agc acg ctg cag 679

Asp Gly Ile Glu Arg Ala Leu Gly Leu Gln Arg Val Ser Thr Leu Gln

200

205

210

gac ctg ctc ttc cac agt gac tgc gtt acc ctg cat tgc ggc ctc aat 727

Asp Leu Leu Phe His Ser Asp Cys Val Thr Leu His Cys Gly Leu Asn

215

220

225

gag cac aac cac cac ctc atc aat gac ttt act gtc aag cag atg aga 775

Glu His Asn His His Leu Ile Asn Asp Phe Thr Val Lys Gln Met Arg

230 235 240 245
caa gga gcc ttt ctg gtg aac aca gcc cgt ggt ggc ctg gtg gat gag 823
Gln Gly Ala Phe Leu Val Asn Thr Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp Glu
250 255 260
aag gca gtg gcc cag gcc ctg aag gaa ggg cgg atc cgt ggc gca gcg 871
Lys Ala Val Ala Gln Ala Leu Lys Glu Gly Arg Ile Arg Gly Ala Ala
265 270 275
ctg gac gtg cat gag tca gag ccc ttc agc ttt agc cag gga ccc tta 919
Leu Asp Val His Glu Ser Glu Pro Phe Ser Phe Ser Gln Gly Pro Leu
280 285 290
aag gat gca ccc aac ctc atc tgc aca ccc cat gct gca tgg tac agt 967
Lys Asp Ala Pro Asn Leu Ile Cys Thr Pro His Ala Ala Trp Tyr Ser
295 300 305
gag cag gcg tcc att gag atg aga gag gag gca gcc cgg gaa atc cgg 1015
Glu Gln Ala Ser Ile Glu Met Arg Glu Glu Ala Ala Arg Glu Ile Arg
310 315 320 325
cga gcc atc aca ggc cgg atc cca gat agc ttg aaa aac tgt gtc aac 1063
Arg Ala Ile Thr Gly Arg Ile Pro Asp Ser Leu Lys Asn Cys Val Asn
330 335 340

aag gac cac ctg aca gcc gcc acg cac tgg gcc agc atg gac cct gct 1111
Lys Asp His Leu Thr Ala Ala Thr His Trp Ala Ser Met Asp Pro Ala

345

350

355

gtg gtg cac cct gag ctc aat ggg gct gcc tac agc agg tac cct cca 1159
Val Val His Pro Glu Leu Asn Gly Ala Ala Tyr Ser Arg Tyr Pro Pro

360

365

370

ggc gtc gtg agt gtg gcc ccc act ggc atc cca gct gct gtg gaa ggg 1207
Gly Val Val Ser Val Ala Pro Thr Gly Ile Pro Ala Ala Val Glu Gly

375

380

385

att gtt ccc agt gcc atg tcc ctg tct cat ggc ctg ccc cct gtg gcc 1255
Ile Val Pro Ser Ala Met Ser Leu Ser His Gly Leu Pro Pro Val Ala

390

395

400

405

cac cca ccc cac gct ccc tct cct ggc cag act gtc aag cct gag gcg 1303
His Pro Pro His Ala Pro Ser Pro Gly Gln Thr Val Lys Pro Glu Ala

410

415

420

gat aga gac cat acg agt gac cag ttg tagcctgtga ggagctgtcc 1350
Asp Arg Asp His Thr Ser Asp Gln Leu

425

430

agccttggca cctggtggag ggtgctgcac gctcttggac ccaagtgtgc agaggtggca 1410

tccagtgtgg gccctagcac tccagagact ggcccgggcg

1450

<210> 6

<211> 4684

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (150)..(4673)

<400> 6

gaagacacct actgtgatga taaggttgct tctgccatct caggccagt aaagtcata 60

tccgaagcct gtgttgaacg agaaggcagt accgctgttg agacaagtcc aaaggctagg 120

ccagggactg tccttagggg ctctctgtt atg atg gct gga gaa ggg tca acc 173

Met Met Ala Gly Glu Gly Ser Thr

1

5

att act agc cgt atc aag aac ttg ctg agg tct cca tcc atc aaa tta 221

Ile Thr Ser Arg Ile Lys Asn Leu Leu Arg Ser Pro Ser Ile Lys Leu

10

15

20

cgc aga agt aaa gca gga aac cgg aga gag gac ctc agc tcc aag gta 269

ggt gtg gct tgt gtg gct ttc tcc cca agt gcc aag tac att gtg tct 605
Gly Val Ala Cys Val Ala Phe Ser Pro Ser Ala Lys Tyr Ile Val Ser
140 145 150

gtg ggc tac cag cat gac atg att gtc aac gtg tgg gcc tgg aag aaa 653
Val Gly Tyr Gln His Asp Met Ile Val Asn Val Trp Ala Trp Lys Lys
155 160 165

aac att gta gtg gcc tcc aac aaa gta tcc agt cgg gta acc gca gtg 701
Asn Ile Val Val Ala Ser Asn Lys Val Ser Ser Arg Val Thr Ala Val
170 175 180

tcc ttt tct gaa gac tgc agc tac ttt gtc act gca ggc aac cgg cac 749
Ser Phe Ser Glu Asp Cys Ser Tyr Phe Val Thr Ala Gly Asn Arg His
185 190 195 200

atc aaa ttc tgg tac ctg gat gac agt aag acc tca aag gtg aac gcc 797
Ile Lys Phe Trp Tyr Leu Asp Asp Ser Lys Thr Ser Lys Val Asn Ala
205 210 215

act gtg ccc ctg ctg ggc cgc tcg ggg ctg ctg ggg gag ctg agg aac 845
Thr Val Pro Leu Leu Gly Arg Ser Gly Leu Leu Gly Glu Leu Arg Asn
220 225 230

aac ctg ttc act gat gtg gcc tgt ggc cga ggg gaa aag gct gat agc 893

Asn Leu Phe Thr Asp Val Ala Cys Gly Arg Gly Glu Lys Ala Asp Ser

235

240

245

act ttc tgt atc acg tcg tcg ggg ctg ctg tgc gag ttc agc gat cgc 941

Thr Phe Cys Ile Thr Ser Ser Gly Leu Leu Cys Glu Phe Ser Asp Arg

250

255

260

agg ctt ctg gac aaa tgg gtg gag cta agg aac aca gac agc ttc aca 989

Arg Leu Leu Asp Lys Trp Val Glu Leu Arg Asn Thr Asp Ser Phe Thr

265

270

275

280

acc act gtg gcc cac tgc atc tct gtc acc caa gaa tac atc ttc tgt 1037

Thr Thr Val Ala His Cys Ile Ser Val Thr Gln Glu Tyr Ile Phe Cys

285

290

295

ggc tgt gct gat ggc acg gtg cgc ctt ttc aat cct tcc aac ctg cac 1085

Gly Cys Ala Asp Gly Thr Val Arg Leu Phe Asn Pro Ser Asn Leu His

300

305

310

ttc ctc agt acc cta ccc aga ccc cat gct ctt gga aca gac att gcc 1133

Phe Leu Ser Thr Leu Pro Arg Pro His Ala Leu Gly Thr Asp Ile Ala

315

320

325

agc atc act gag gcc agt cgc ctc ttt tct gga ggg gtc aat gca agg 1181

Ser Ile Thr Glu Ala Ser Arg Leu Phe Ser Gly Gly Val Asn Ala Arg

330

335

340

tac cca gac acc att gcc ttg acc ttc gat cca act aat cag tgg cta 1229
Tyr Pro Asp Thr Ile Ala Leu Thr Phe Asp Pro Thr Asn Gln Trp Leu
345 350 355 360

tct tgt gta tac aac gac cac agc ata tat gtt tgg gat gtg agg gac 1277
Ser Cys Val Tyr Asn Asp His Ser Ile Tyr Val Trp Asp Val Arg Asp
365 370 375

ccc aag aaa gtg ggg aag gtg tac tcc gct ctg tat cac tcc tcc tgt 1325
Pro Lys Lys Val Gly Lys Val Tyr Ser Ala Leu Tyr His Ser Ser Cys
380 385 390

gtc tgg agt gtg gag gtc tac cct gag atc aag gac agt cac cag gcc 1373
Val Trp Ser Val Glu Val Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Ser His Gln Ala
395 400 405

tgt ctt ccc ctc agt tcc ttt att act tgc tcc tca gac aac acc atc 1421
Cys Leu Pro Leu Ser Ser Phe Ile Thr Cys Ser Ser Asp Asn Thr Ile
410 415 420

cgc ctg tgg aac aca gag agc tct ggg gta cat ggc tct acc ctg cac 1469
Arg Leu Trp Asn Thr Glu Ser Ser Gly Val His Gly Ser Thr Leu His
425 430 435 440

cgt aac atc ctc agc aat gat ctc att aag atc atc tat gtg gat ggg 1517

Arg Asn Ile Leu Ser Asn Asp Leu Ile Lys Ile Ile Tyr Val Asp Gly

445

450

455

aac act cag gct ttg ttg gac act gag ctg cct gga gga gac aaa gct 1565

Asn Thr Gln Ala Leu Leu Asp Thr Glu Leu Pro Gly Gly Asp Lys Ala

460

465

470

gat ggg tcg ctg atg gac ccc cga gtg ggc atc cgg tcc gtg tgt att 1613

Asp Gly Ser Leu Met Asp Pro Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Cys Ile

475

480

485

agc ccc aat gga cag cac ctg gcc tcg gga gac cgc atg ggg aca ctt 1661

Ser Pro Asn Gly Gln His Leu Ala Ser Gly Asp Arg Met Gly Thr Leu

490

495

500

agg ata cat gaa ctg cag tcc ctg agt gag atg ctg aaa gtg gag gcc 1709

Arg Ile His Glu Leu Gln Ser Leu Ser Glu Met Leu Lys Val Glu Ala

505

510

515

520

cac gac tct gag atc ttg tgc ctg gag tac tct aag cca gac aca ggt 1757

His Asp Ser Glu Ile Leu Cys Leu Glu Tyr Ser Lys Pro Asp Thr Gly

525

530

535

ttg aaa ctg cta gca tcg gca agc cgg gac cgt ctg atc cac gag ctg 1805

Leu Lys Leu Leu Ala Ser Ala Ser Arg Asp Arg Leu Ile His Glu Leu

540

545

550

Gly Lys Gln Lys Lys Leu Phe Lys Gly Ser Gln Gly Glu Asp Gly Thr
650 655 660

ctc att aag gtg cag aca gac ccc tca ggg atc tac att gcc act agc 2189
Leu Ile Lys Val Gln Thr Asp Pro Ser Gly Ile Tyr Ile Ala Thr Ser
665 670 675 680

tgt tcc gat aag aat ctc tcc att ttt gac ttc tcc tca ggc gag tgt 2237
Cys Ser Asp Lys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Phe Ser Ser Gly Glu Cys
685 690 695

gtg gcc acc atg ttt ggc cac tca gag att gtc act ggc atg aaa ttt 2285
Val Ala Thr Met Phe Gly His Ser Glu Ile Val Thr Gly Met Lys Phe
700 705 710

agt aac gat tgc aaa cat ctc atc tct gtg tca ggg gac agc tgc atc 2333
Ser Asn Asp Cys Lys His Leu Ile Ser Val Ser Gly Asp Ser Cys Ile
715 720 725

ttt gtc tgg cgt ctg agc tct gag atg acc atc agc atg agg cag cgc 2381
Phe Val Trp Arg Leu Ser Ser Glu Met Thr Ile Ser Met Arg Gln Arg
730 735 740

ctg cgt gag cgg cgg cag cgc cag cga ggg atc aag cag caa gga cca 2429
Leu Arg Glu Arg Arg Gln Arg Gln Arg Gly Ile Lys Gln Gln Gly Pro
745 750 755 760

acg tct ccc cag agg gct tct gga gcc aag cag cac cat gct cca gtg 2477
Thr Ser Pro Gln Arg Ala Ser Gly Ala Lys Gln His His Ala Pro Val
765 770 775

gta ccc cct tct gga cca gct ctt tcc tca gac agt gac aag gag gga 2525
Val Pro Pro Ser Gly Pro Ala Leu Ser Ser Asp Ser Asp Lys Glu Gly
780 785 790

gaa gat gag ggt act gaa gaa gaa gaa ttg cca gct ctg ccc atc ctt 2573
Glu Asp Glu Gly Thr Glu Glu Glu Glu Leu Pro Ala Leu Pro Ile Leu
795 800 805

agc aag agc acc aag aaa gaa cta gcc tca ggc tct agt cca gcc ttg 2621
Ser Lys Ser Thr Lys Lys Glu Leu Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Leu
810 815 820

ctc cga agc ctg tcc cac tgg gaa atg agt cgg gca caa gag acc atg 2669
Leu Arg Ser Leu Ser His Trp Glu Met Ser Arg Ala Gln Glu Thr Met
825 830 835 840

gag tac ctg gac cca gct cct gta gct aac aca gga cct aaa aga aga 2717
Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Pro Val Ala Asn Thr Gly Pro Lys Arg Arg
845 850 855

ggg cgc tgg gct cag cca ggc gtg gag ctg agt gtt cgc tcc atg ttg 2765

Gly Arg Trp Ala Gln Pro Gly Val Glu Leu Ser Val Arg Ser Met Leu
860 865 870

gac ctg aga cag ata gag acc tta gcc cca agc cct cga ggc ccc agc 2813
Asp Leu Arg Gln Ile Glu Thr Leu Ala Pro Ser Pro Arg Gly Pro Ser
875 880 885

cag gac tca ctg gct gtg tcc cca gct ggt cct ggg aag cat ggt cca 2861
Gln Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro Ala Gly Pro Gly Lys His Gly Pro
890 895 900

cag gcc cct gag ctg tca tgt gtc agt cag aat gaa agg gcc cct cgg 2909
Gln Ala Pro Glu Leu Ser Cys Val Ser Gln Asn Glu Arg Ala Pro Arg
905 910 915 920

ctt cag acc tcc caa ccc tgc tcc tgc ccc gac att atc caa ttg ttg 2957
Leu Gln Thr Ser Gln Pro Cys Ser Cys Pro Asp Ile Ile Gln Leu Leu
925 930 935

tca caa gag gaa gga gtc ttt gcc caa gat ctg gag cct gca ccc att 3005
Ser Gln Glu Glu Gly Val Phe Ala Gln Asp Leu Glu Pro Ala Pro Ile
940 945 950

gaa gat ggt att gtc tac ccg gaa ccc agt gac agc cct acc atg gat 3053
Glu Asp Gly Ile Val Tyr Pro Glu Pro Ser Asp Ser Pro Thr Met Asp
955 960 965

acc agt gcg ttt cag gtg cag gct cca acc gga gga tcc cta gga aga 3101
Thr Ser Ala Phe Gln Val Gln Ala Pro Thr Gly Gly Ser Leu Gly Arg
970 975 980

atg tac cca ggc agc agg ggc tca gaa aag cac agt cct gac agt gca 3149
Met Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser Glu Lys His Ser Pro Asp Ser Ala
985 990 995 1000

tgc tct gtg gat tac agc agc agc cgg ctt tcc agc cct gaa cac cct 3197
Cys Ser Val Asp Tyr Ser Ser Ser Arg Leu Ser Ser Pro Glu His Pro
1005 1010 1015

aat gaa gac tct gag agc aca gag ccc cta agt gtg gat ggc atc tcc 3245
Asn Glu Asp Ser Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Val Asp Gly Ile Ser
1020 1025 1030

tca gac ctg gaa gag cca gcc gag ggt gat gaa gac gag gaa gaa gag 3293
Ser Asp Leu Glu Glu Pro Ala Glu Gly Asp Glu Asp Glu Glu Glu Glu
1035 1040 1045

gga ggc act ggc ctc tgt ggg cta cag gaa ggc ggc cct cgt acc cca 3341
Gly Gly Thr Gly Leu Cys Gly Leu Gln Glu Gly Gly Pro Arg Thr Pro
1050 1055 1060

gat cag gaa cag ttt cta aaa cag ctc ttt gag act ctg gcc aat ggg 3389

Asp Gln Glu Gln Phe Leu Lys Gln Leu Phe Glu Thr Leu Ala Asn Gly
 1065 1070 1075 1080

act gct cca ggg ggc cca gca cgg gtg cta gag agg aca gag tct cgg 3437
 Thr Ala Pro Gly Gly Pro Ala Arg Val Leu Glu Arg Thr Glu Ser Arg
 1085 1090 1095

agc atc tca tca cga ttc ctt ctg caa gtg cag acc ctc cca ctc agg 3485
 Ser Ile Ser Ser Arg Phe Leu Leu Gln Val Gln Thr Leu Pro Leu Arg
 1100 1105 1110

gaa cca tcc cta tcc tcc tca ggc ttg gcc ctg acg tcc aga cct gac 3533
 Glu Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gly Leu Ala Leu Thr Ser Arg Pro Asp
 1115 1120 1125

cag gta tca cag gtg tct ggt gag cag ctg aaa ggc agt ggt gcc act 3581
 Gln Val Ser Gln Val Ser Gly Glu Gln Leu Lys Gly Ser Gly Ala Thr
 1130 1135 1140

cct cca gga gca ccc cca gaa atg gaa ccc tct tct ggc aac tct ggc 3629
 Pro Pro Gly Ala Pro Pro Glu Met Glu Pro Ser Ser Gly Asn Ser Gly
 1145 1150 1155 1160

ccc aag cag gtg gct cct gtg ctg ttg aca cga cgg cgt aac aac ttg 3677
 Pro Lys Gln Val Ala Pro Val Leu Leu Thr Arg Arg Arg Asn Asn Leu
 1165 1170 1175

gac aac agc tgg gcc tcc aag aaa atg gct gca acc cgg cct tta gct 3725
Asp Asn Ser Trp Ala Ser Lys Lys Met Ala Ala Thr Arg Pro Leu Ala

1180

1185

1190

gga ctc cag aaa gcc cag tct gtg cat agt ttg gta cca cag gat gag 3773
Gly Leu Gln Lys Ala Gln Ser Val His Ser Leu Val Pro Gln Asp Glu

1195

1200

1205

gtg cct tca tca cgt cca ctg ctc ttc cgg gag gca gag acc cag ggc 3821
Val Pro Ser Ser Arg Pro Leu Leu Phe Arg Glu Ala Glu Thr Gln Gly

1210

1215

1220

agc tta gga tcc ctg cca caa gct ggt ggc tgc tca tct cag ccc cac 3869
Ser Leu Gly Ser Leu Pro Gln Ala Gly Gly Cys Ser Ser Gln Pro His

1225

1230

1235

1240

tcc tac cag aac cac acc acc agt tct atg gcc aag cta gcg cgt agt 3917
Ser Tyr Gln Asn His Thr Thr Ser Ser Met Ala Lys Leu Ala Arg Ser

1245

1250

1255

att tct gtt ggc gag aat ccg ggc ctg gca act gaa cct caa gct cct 3965
Ile Ser Val Gly Glu Asn Pro Gly Leu Ala Thr Glu Pro Gln Ala Pro

1260

1265

1270

gca ccg atc cga atc tca cca ttc aac aaa cta gct ctg cct agc agg 4013

Ala Pro Ile Arg Ile Ser Pro Phe Asn Lys Leu Ala Leu Pro Ser Arg
1275 1280 1285

gct cac ctt gtc ctg gac atc ccc aaa cca ctt cct gac cgt cct act 4061
Ala His Leu Val Leu Asp Ile Pro Lys Pro Leu Pro Asp Arg Pro Thr
1290 1295 1300

ctg acc aca ttc tca cct gta tcc aag ggc ctg acc cac aat gaa aca 4109
Leu Thr Thr Phe Ser Pro Val Ser Lys Gly Leu Thr His Asn Glu Thr
1305 1310 1315 1320

gaa caa tcg ggg ccc ctt cgt gag cct agg aag gct cat act aca gtt 4157
Glu Gln Ser Gly Pro Leu Arg Glu Pro Arg Lys Ala His Thr Thr Val
1325 1330 1335

gaa aag cac tcc tgt tta ggg gag ggt act act cat aaa tct agg aca 4205
Glu Lys His Ser Cys Leu Gly Glu Gly Thr Thr His Lys Ser Arg Thr
1340 1345 1350

gag tgc cag gct tat cct gga ccc aac cac ccc tgt cgc cag caa ctg 4253
Glu Cys Gln Ala Tyr Pro Gly Pro Asn His Pro Cys Arg Gln Gln Leu
1355 1360 1365

cca gtc aac aac ctt ctc caa gct gag agc ttg cag ccc ctg tcc cct 4301
Pro Val Asn Asn Leu Leu Gln Ala Glu Ser Leu Gln Pro Leu Ser Pro
1370 1375 1380

gag aag act cgt aac ccc gtg gaa agc agc agg cca ggg gta gcc ctg 4349
 Glu Lys Thr Arg Asn Pro Val Glu Ser Ser Arg Pro Gly Val Ala Leu
 1385 1390 1395 1400

agc cag gac tca gaa ctg gcc ttg agt ctg caa cag tgt gaa cag ctc 4397
 Ser Gln Asp Ser Glu Leu Ala Leu Ser Leu Gln Gln Cys Glu Gln Leu
 1405 1410 1415

gtg gca gag ctc cag ggg aat gta cgc cag gca gtg gag ctc tac cgc 4445
 Val Ala Glu Leu Gln Gly Asn Val Arg Gln Ala Val Glu Leu Tyr Arg
 1420 1425 1430

gcg gtg acc agc tgt aag aca cct tcg gca gag caa agt cac atc acc 4493
 Ala Val Thr Ser Cys Lys Thr Pro Ser Ala Glu Gln Ser His Ile Thr
 1435 1440 1445

cgt ctc ctg aga gac acc ttc tct ccg gtg cga cag gag ctc gag gtt 4541
 Arg Leu Leu Arg Asp Thr Phe Ser Pro Val Arg Gln Glu Leu Glu Val
 1450 1455 1460

ctg gct ggg gca gtg ctg tcc agc cca ggt ggc agc cct ggg gct gtg 4589
 Leu Ala Gly Ala Val Leu Ser Ser Pro Gly Gly Ser Pro Gly Ala Val
 1465 1470 1475 1480

gcg gct gag cag acg cag gcc ctg ttg gag caa tac tcc gag cta ctg 4637

Ala Ala Glu Gln Thr Gln Ala Leu Leu Glu Gln Tyr Ser Glu Leu Leu

1485

1490

1495

cta aga gct gtg gag cgg cgc atg gag cgc aga ctc tgagctcctg a 4684

Leu Arg Ala Val Glu Arg Arg Met Glu Arg Arg Leu

1500

1505

<210> 7

<211> 734

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(732)

<400> 7

agt agc aaa tat tca aac gag tcg aga agc cag gcg gac tct ggc ttc 48

Ser Ser Lys Tyr Ser Asn Glu Ser Arg Ser Gln Ala Asp Ser Gly Phe

1

5

10

15

ctg ggg ctg cgg ccg acc tcg gtg gat ccc gct ctg agg cgg cgg cgg 96

Leu Gly Leu Arg Pro Thr Ser Val Asp Pro Ala Leu Arg Arg Arg

20

25

30

130	135	140	
tta tgg gag aaa ctg gca aag cag ggc gaa ctg ccc agg gat gtg cgc	480		
Leu Trp Glu Lys Leu Ala Lys Gln Gly Glu Leu Pro Arg Asp Val Arg			
145	150	155	160
aag gca cag gcc cga ctc ctt agc cct ccc aca cca aag gcc aaa cct	528		
Lys Ala Gln Ala Arg Leu Leu Ser Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Pro			
165	170	175	
ggg ccc cag gac atc att gag cga ccc ttc tat gac ctc tgg aac cca	576		
Gly Pro Gln Asp Ile Ile Glu Arg Pro Phe Tyr Asp Leu Trp Asn Pro			
180	185	190	
gac aac cct ctg gac acg cct ttg att ggt cag gat gca ttt ttt ctg	624		
Asp Asn Pro Leu Asp Thr Pro Leu Ile Gly Gln Asp Ala Phe Phe Leu			
195	200	205	
gaa cag acc aag aag aaa ggc gtg agg cgg cca caa cgc ctc cac atc	672		
Glu Gln Thr Lys Lys Lys Gly Val Arg Arg Pro Gln Arg Leu His Ile			
210	215	220	
aag cct tcc cag gtg cct gca gtg gag gtg att cct gca gga gcc tcc	720		
Lys Pro Ser Gln Val Pro Ala Val Glu Val Ile Pro Ala Gly Ala Ser			
225	230	235	240

Leu	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Gln	Glu	Arg	Thr	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Ala	
65					70						75					
gag gcc cca aac gaa aag ctc ttc ttc gtg gac aca gga ttc aag aga 291																
Glu	Ala	Pro	Asn	Glu	Lys	Leu	Phe	Phe	Val	Asp	Thr	Gly	Phe	Lys	Arg	
80					85					90				95		
aaa gaa cca aga aag aag agg acc ttg gtc cag aag aag tca cag cgt 339																
Lys	Glu	Pro	Arg	Lys	Lys	Arg	Thr	Leu	Val	Gln	Lys	Lys	Ser	Gln	Arg	
			100						105					110		
ctc cag aaa ccc tta cgg gtt gac ctt gcc ctt gag aat cat tct aag 387																
Leu	Gln	Lys	Pro	Leu	Arg	Val	Asp	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	His	Ser	Lys	
			115					120						125		
atc cct gct ccc aaa gac atc ctc gca cat cag gtc cct aat gcc aag 435																
Ile	Pro	Ala	Pro	Lys	Asp	Ile	Leu	Ala	His	Gln	Val	Pro	Asn	Ala	Lys	
			130					135						140		
aag ctc agg cga aag gag gag tta tgg gag aaa ctg gca aag cag ggc 483																
Lys	Leu	Arg	Arg	Lys	Glu	Glu	Leu	Trp	Glu	Lys	Leu	Ala	Lys	Gln	Gly	
			145					150						155		
gaa ctg ccc agg gat gtg cgc aag gca cag gcc cga ctc ctt agc cct 531																
Glu	Leu	Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Lys	Ala	Gln	Ala	Arg	Leu	Leu	Ser	Pro	
160								165						175		
ccc aca cca aag gcc aaa cct ggg ccc cag gac atc att gag cga ccc 579																
Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Lys	Pro	Gly	Pro	Gln	Asp	Ile	Ile	Glu	Arg	Pro	
					180									190		
ttc tat gac ctc tgg aac cca gac aac cct ctg gac acg cct ttg att 627																
Phe	Tyr	Asp	Leu	Trp	Asn	Pro	Asp	Asn	Pro	Leu	Asp	Thr	Pro	Leu	Ile	
			195					200						205		
ggc cag gat gca ttt ttt ctg gaa cag acc aag aag aaa ggc gtg agg 675																
Gly	Gln	Asp	Ala	Phe	Phe	Leu	Glu	Gln	Thr	Lys	Lys	Lys	Gly	Val	Arg	

cgg ctt cag cac caa gaa ctt ttc agg ctg cgt ggg atc aag gcc cag 1155
 Arg Leu Gln His Gln Glu Leu Phe Arg Leu Arg Gly Ile Lys Ala Gln
 370 375 380

gtg gcc cga agg ctg gca gaa ctg gca cgc cgg agg gag cag cgg cgc 1203
 Val Ala Arg Arg Leu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Arg Glu Gln Arg Arg
 385 390 395

ata cgg cga ctg gca gag gct gac aag ccc cga agg ctg gga cgg ctc 1251
 Ile Arg Arg Leu Ala Glu Ala Asp Lys Pro Arg Arg Leu Gly Arg Leu
 400 405 410 415

aag tac cag gct cct gac att gat gtg cag ctc agc tct gag ttg tct 1299
 Lys Tyr Gln Ala Pro Asp Ile Asp Val Gln Leu Ser Ser Glu Leu Ser
 420 425 430

ggc tca ctc agg aca ctg aag cca gaa ggt cac att ctc cga gac agg 1347
 Gly Ser Leu Arg Thr Leu Lys Pro Glu Gly His Ile Leu Arg Asp Arg
 435 440 445

ttc aag agc ttc cag aag aga aat atg att gag ccc cga gaa cga gcc 1395
 Phe Lys Ser Phe Gln Lys Arg Asn Met Ile Glu Pro Arg Glu Arg Ala
 450 455 460

aag ttc aag cgc aaa tac aaa gtg aag ctg gtg gag aag cgg gcc tac 1443
 Lys Phe Lys Arg Lys Tyr Lys Val Lys Leu Val Glu Lys Arg Ala Tyr
 465 470 475

cgt gag att cag ttg tag ctgtgcagat g 1469
 Arg Glu Ile Gln Leu
 480

<210> 9

<211> 1305

115 120 125
Tyr Glu Phe Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala
130 135 140
Asp Gln Ile Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu
145 150 155 160
Tyr Asn Ala Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val
165 170 175
Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln
180 185 190
Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu
195 200 205
Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser
210 215 220
Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr
225 230 235 240
Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro
245 250 255

Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys
260 265 270

Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val
275 280 285

Gln Val Thr Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser
290 295 300

Asp Glu Trp Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu
305 310 315 320

Asp Val Cys Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr
325 330 335

Gln Gly Ile Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr
340 345 350

His Glu Leu Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu
355 360 365

Gly Ala Asp Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly
370 375 380

Met Gly Lys Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu
385 390 395 400

Glu Thr Lys Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys
405 410 415

Val Asp Gln Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu
420 425 430

Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu
435 440 445

Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg
450 455 460

Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu
465 470 475 480

Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu
485 490 495

Met Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met
500 505 510

Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg
515 520 525

Glu His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe

530

535

540

Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg

545

550

555

560

Ser Tyr Pro Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly

565

570

575

Phe Ser Gln Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser

580

585

590

Arg Pro Leu Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg

595

600

605

Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg

610

615

620

Asn Asp Asp Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys

625

630

635

640

Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys

645

650

655

Asn Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro

660

665

670

945 950 955 960

Cys Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His

 965 970 975

Val Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile

 980 985 990

Phe His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu

 995 1000 1005

Met Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val

 1010 1015 1020

Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln

025 1030 1035 1040

Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg

 1045 1050 1055

Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val

 1060 1065 1070

Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His

 1075 1080 1085

Asp Asp Tyr Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu
20 25 30

Ala Gly Ser Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp
35 40 45

Glu Glu Val Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu
50 55 60

Asn Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu
65 70 75 80

Glu Leu Leu Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg
85 90 95

Glu Lys Ala Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu
100 105 110

Asp Ala Leu Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His
115 120 125

Tyr Glu Phe Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala
130 135 140

Asp Gln Ile Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu
145 150 155 160

Tyr Asn Ala Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val

165

170

175

Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln

180

185

190

Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Ser Pro Arg Gln Ser Trp Arg Lys

195

200

205

Ser Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp

210

215

220

Gly Met Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala

225

230

235

240

Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser

245

250

255

Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro

260

265

270

Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu

275

280

285

Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln Val Thr Gln Glu Met Arg

Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val
435 440 445

Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val
450 455 460

Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu .
465 470 475 480

Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala
485 490 495

Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu Met Ala Arg Val Leu Met Glu
500 505 510

Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg
515 520 525

Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg Glu His Pro Ser Val Gln Glu
530 535 540

Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser
545 550 555 560

Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg Ser Tyr Pro Ser Val Asn Ile
565 570 575

His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly Phe Ser Gln Arg Arg Ser His
580 585 590

Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg Pro Leu Glu Phe Phe Pro
595 600 605

Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln
610 615 620

Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn Asp Asp Gly Arg Leu Gln
625 630 635 640

Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn
645 650 655

Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn Val Pro Val Pro Val Tyr
660 665 670

Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser Thr Lys Leu Trp Cys Ala
675 680 685

Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro His Glu Glu Asp Ser Ser
690 695 700

Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp Pro Leu Thr Cys Asp Arg

705 710 715 720
Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His Pro Ser Pro Glu Lys Lys
 725 730 735
Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala Thr Ser Ser Arg Val Trp
 740 745 750
Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys Val Val Ile Ile Asp Ala
 755 760 765
Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe Thr Val Cys Asn Ala His
 770 775 780
Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala Ser Asp Ser Asp Tyr Pro
785 790 795 800
Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val Asn Pro Glu Asp Ser Gly
 805 810 815
Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu Val Gly Cys Ala Thr Arg
 820 825 830
Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser Arg Gly Asp Thr Pro Val
 835 840 845

Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr Thr Ala Asn Gly Lys Val
850 855 860

Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr Glu Ala Thr Glu Val Pro
865 870 875 880

Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr Thr Val Arg Pro Gly Pro
885 890 895

Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala Pro Thr Pro Ser Ser Ser
900 905 910

Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu Ser Asn Gly Thr Ile Val
915 920 925

Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu Ser Thr Thr Thr Ser Ser
930 935 940

Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Val
945 950 955 960

His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys Leu His Ser Ile Lys Leu
965 970 975

Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val Lys Gly Arg Val Leu Val
980 985 990

Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe His Arg Gly Glu Asp Gly

995

1000

1005

Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met Asp Leu Gly His Pro His

1010

1015

1020

His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly

025

1030

1035

1040

Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu

1045

1050

1055

Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu

1060

1065

1070

Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr

1075

1080

1085

Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln His Leu Gln Asp Val Asp

1090

1095

1100

Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Gly Phe

105

1110

1115

1120

Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile Ala Gly Asn Arg Leu Trp

1125

1130

1135

Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser Ile Pro Leu Thr Glu Thr

1140

1145

1150

Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly Leu Arg Ala Asn Lys Thr

1155

1160

1165

Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro Gly Gly Ile Ile His Val

1170

1175

1180

Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala Ser Ser Phe Ile Pro Tyr

185

1190

1195

1200

Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe His Gly His Arg Asp Ala

1205

1210

1215

Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn Val Leu Ala Thr Leu Asn

1220

1225

1230

Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Pro

1235

1240

1245

Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys Asn Ala Leu Val Leu Ser

1250

1255

1260

Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile Gly Asp Gly Glu Asp Asp
265 1270 1275 1280

Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val Asn Gln Thr Lys Pro Ser Leu
1285 1290 1295

Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile Val Trp Gln Val Ser Tyr Thr
1300 1305 1310

Pro Glu

<210> 11

<211> 1337

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 11

Met Met Glu Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln
1 5 10 15

Asp Asp Tyr Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu
20 25 30

Ala Gly Ser Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp

Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln
180 185 190

Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Ser Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser
195 200 205

Leu Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly
210 215 220

Gly Lys Leu Val Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly
225 230 235 240

Gln Leu Gln Ser Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser
245 250 255

Glu Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr
260 265 270

Lys Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro
275 280 285

Leu Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys
290 295 300

Asn Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val
305 310 315 320

450

455

460

Ala Ala Lys Gln Ala Lys Val Lys Leu Glu Asn Arg Ile Lys Glu Leu

465

470

475

480

Glu Glu Glu Leu Lys Arg Val Lys Ser Glu Ala Val Thr Ala Arg Arg

485

490

495

Glu Pro Arg Glu Glu Val Glu Asp Val Ser Ser Tyr Leu Cys Thr Glu

500

505

510

Leu Asp Lys Ile Pro Met Ala Gln Arg Arg Arg Phe Thr Arg Val Glu

515

520

525

Met Ala Arg Val Leu Met Glu Arg Asn Gln Tyr Lys Glu Arg Leu Met

530

535

540

Glu Leu Gln Glu Ala Val Arg Trp Thr Glu Met Ile Arg Ala Ser Arg

545

550

555

560

Glu His Pro Ser Val Gln Glu Lys Lys Lys Ser Thr Ile Trp Gln Phe

565

570

575

Phe Ser Arg Leu Phe Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Pro Ala Lys Arg

580

585

590

Ser Tyr Pro Ser Val Asn Ile His Tyr Lys Ser Pro Thr Ala Ala Gly
595 600 605

Phe Ser Gln Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser
610 615 620

Arg Pro Leu Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg
625 630 635 640

Arg Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg
645 650 655

Asn Asp Asp Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys
660 665 670

Tyr Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys
675 680 685

Asn Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro
690 695 700

Ser Thr Lys Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys
705 710 715 720

Pro His Glu Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg
725 730 735

Asp Pro Leu Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr
740 745 750

His Pro Ser Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp
755 760 765

Ala Thr Ser Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser
770 775 780

Lys Val Val Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln
785 790 795 800

Phe Thr Val Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala
805 810 815

Ala Ser Asp Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp
820 825 830

Val Asn Pro Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr
835 840 845

Leu Val Gly Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser
850 855 860

Ser Arg Gly Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala

865 870 875 880
Thr Thr Ala Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala
 885 890 895
Thr Glu Ala Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala
 900 905 910
Thr Thr Val Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro
 915 920 925
Ala Pro Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser
 930 935 940
Glu Ser Asn Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu
945 950 955 960
Leu Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala
 965 970 975
Gln Asn Gly Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys
 980 985 990
Cys Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His
 995 1000 1005

Val Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile

1010

1015

1020

Phe His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu

025

1030

1035

1040

Met Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val

1045

1050

1055

Asn Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln

1060

1065

1070

Pro Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg

1075

1080

1085

Glu Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val

1090

1095

1100

Ser Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His

105

1110

1115

1120

Gln His Leu Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu

1125

1130

1135

Gly Thr Gly Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu

1140

1145

1150

Ile Ala Gly Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile

1155

1160

1165

Ser Ile Pro Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu

1170

1175

1180

Gly Leu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg

185

1190

1195

1200

Pro Gly Gly Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala

1205

1210

1215

Ala Ser Ser Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys

1220

1225

1230

Phe His Gly His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly

1235

1240

1245

Asn Val Leu Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu

1250

1255

1260

Gly Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu

265

1270

1275

1280

Lys Asn Ala Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg

1285

1290

1295

Ile Gly Asp Gly Glu Asp Asp Glu Thr Glu Glu Cys Ala Gly Asp Val

1300

1305

1310

Asn Gln Thr Lys Pro Ser Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ser His Ile Ile

1315

1320

1325

Val Trp Gln Val Ser Tyr Thr Pro Glu

1330

1335

<210> 12

<211> 1336

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 12

Met Met Glu Ile Gln Met Asp Glu Gly Gly Gly Val Val Val Tyr Gln

1

5

10

15

Asp Asp Tyr Cys Ser Gly Ser Val Met Ser Glu Arg Val Ser Gly Leu

20

25

30

Ala Gly Ser Ile Tyr Arg Glu Phe Glu Arg Leu Ile His Cys Tyr Asp

35

40

45

Glu Glu Val Val Lys Glu Leu Met Pro Leu Val Val Asn Val Leu Glu

50

55

60

Asn Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Asn Gln Glu His Glu Val Glu Leu

65

70

75

80

Glu Leu Leu Arg Glu Asp Asn Glu Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Glu Arg

85

90

95

Glu Lys Ala Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Lys Phe Ile Glu Phe Glu

100

105

110

Asp Ala Leu Glu Gln Glu Lys Lys Glu Leu Gln Ile Gln Val Glu His

115

120

125

Tyr Glu Phe Gln Thr Arg Gln Leu Glu Leu Lys Ala Lys Asn Tyr Ala

130

135

140

Asp Gln Ile Ser Arg Leu Glu Glu Arg Glu Ser Glu Met Lys Lys Glu

145

150

155

160

Tyr Asn Ala Leu His Gln Arg His Thr Glu Met Ile Gln Thr Tyr Val

165

170

175

Glu His Ile Glu Arg Ser Lys Met Gln Gln Val Gly Gly Ser Gly Gln

180 185 190

Thr Glu Ser Ser Leu Pro Gly Arg Arg Lys Glu Arg Pro Thr Ser Leu
195 200 205

Asn Val Phe Pro Leu Ala Asp Gly Met Val Arg Ala Gln Met Gly Gly
210 215 220

Lys Leu Val Pro Ala Gly Asp His Trp His Leu Ser Asp Leu Gly Gln
225 230 235 240

Leu Gln Ser Ser Ser Ser Tyr Gln Cys Pro Asn Asp Glu Met Ser Glu
245 250 255

Ser Gly Gln Ser Ser Ala Ala Ala Thr Pro Ser Thr Thr Gly Thr Lys
260 265 270

Ser Asn Thr Pro Thr Ser Ser Val Pro Ser Ala Ala Val Thr Pro Leu
275 280 285

Asn Glu Ser Leu Gln Pro Leu Gly Asp Tyr Val Ser Val Thr Lys Asn
290 295 300

Asn Lys Gln Ala Arg Glu Lys Arg Asn Ser Arg Asn Met Glu Val Gln
305 310 315 320

Val Thr Gln Glu Met Arg Asn Val Ser Ile Gly Met Gly Ser Ser Asp

325

330

335

Glu Trp Ser Asp Val Gln Asp Ile Ile Asp Ser Thr Pro Glu Leu Asp

340

345

350

Val Cys Pro Glu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Gly Ser Ser Pro Thr Gln

355

360

365

Gly Ile Val Asn Lys Ala Phe Gly Ile Asn Thr Asp Ser Leu Tyr His

370

375

380

Glu Leu Ser Thr Ala Gly Ser Glu Val Ile Gly Asp Val Asp Glu Gly

385

390

395

400

Ala Asp Leu Leu Gly Glu Phe Ser Val Arg Asp Asp Phe Phe Gly Met

405

410

415

Gly Lys Glu Val Gly Asn Leu Leu Leu Glu Asn Ser Gln Leu Leu Glu

420

425

430

Thr Lys Asn Ala Leu Asn Val Val Lys Asn Asp Leu Ile Ala Lys Val

435

440

445

Asp Gln Leu Ser Gly Glu Gln Glu Val Leu Lys Gly Glu Leu Glu Ala

450

455

460

595

600

605

Ser Gln Arg Arg Ser His Ala Leu Cys Gln Ile Ser Ala Gly Ser Arg

610

615

620

Pro Leu Glu Phe Phe Pro Asp Asp Asp Cys Thr Ser Ser Ala Arg Arg

625

630

635

640

Glu Gln Lys Arg Glu Gln Tyr Arg Gln Val Arg Glu His Val Arg Asn

645

650

655

Asp Asp Gly Arg Leu Gln Ala Cys Gly Trp Ser Leu Pro Ala Lys Tyr

660

665

670

Lys Gln Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gln Glu Asp Thr Arg Met Lys Asn

675

680

685

Val Pro Val Pro Val Tyr Cys Arg Pro Leu Val Glu Lys Asp Pro Ser

690

695

700

Thr Lys Leu Trp Cys Ala Ala Gly Val Asn Leu Ser Gly Trp Lys Pro

705

710

715

720

His Glu Glu Asp Ser Ser Asn Gly Pro Lys Pro Val Pro Gly Arg Asp

725

730

735

Pro Leu Thr Cys Asp Arg Glu Gly Glu Gly Glu Pro Lys Ser Thr His

740

745

750

Pro Ser Pro Glu Lys Lys Lys Ala Lys Glu Thr Pro Glu Ala Asp Ala

755

760

765

Thr Ser Ser Arg Val Trp Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Thr Ser Lys

770

775

780

Val Val Ile Ile Asp Ala Asn Gln Pro Gly Thr Ile Val Asp Gln Phe

785

790

795

800

Thr Val Cys Asn Ala His Val Leu Cys Ile Ser Ser Ile Pro Ala Ala

805

810

815

Ser Asp Ser Asp Tyr Pro Pro Gly Glu Met Phe Leu Asp Ser Asp Val

820

825

830

Asn Pro Glu Asp Ser Gly Ala Asp Gly Val Leu Ala Gly Ile Thr Leu

835

840

845

Val Gly Cys Ala Thr Arg Cys Asn Val Pro Arg Ser Asn Cys Ser Ser

850

855

860

Arg Gly Asp Thr Pro Val Leu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Val Ala Thr

865

870

875

880

Thr Ala Asn Gly Lys Val Asn Pro Ser Gln Ser Thr Glu Glu Ala Thr

885

890

895

Glu Ala Thr Glu Val Pro Asp Pro Gly Pro Ser Glu Ser Glu Ala Thr

900

905

910

Thr Val Arg Pro Gly Pro Leu Thr Glu His Val Phe Thr Asp Pro Ala

915

920

925

Pro Thr Pro Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Glu Asn Gly Ser Glu

930

935

940

Ser Asn Gly Thr Ile Val Gln Pro Gln Val Glu Pro Ser Gly Glu Leu

945

950

955

960

Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr Met Trp Leu Gly Ala Gln

965

970

975

Asn Gly Trp Leu Tyr Val His Ser Ala Val Ala Asn Trp Lys Lys Cys

980

985

990

Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asp Ser Val Leu Ser Leu Val His Val

995

1000

1005

Lys Gly Arg Val Leu Val Ala Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ala Ile Phe

1010	1015	1020
His Arg Gly Glu Asp Gly Gln Trp Asp Leu Ser Asn Tyr His Leu Met		
025	1030	1035
		1040
Asp Leu Gly His Pro His His Ser Ile Arg Cys Met Ala Val Val Asn		
1045	1050	1055
Asp Arg Val Trp Cys Gly Tyr Lys Asn Lys Val His Val Ile Gln Pro		
1060	1065	1070
Lys Thr Met Gln Ile Glu Lys Ser Phe Asp Ala His Pro Arg Arg Glu		
1075	1080	1085
Ser Gln Val Arg Gln Leu Ala Trp Ile Gly Asp Gly Val Trp Val Ser		
1090	1095	1100
Ile Arg Leu Asp Ser Thr Leu Arg Leu Tyr His Ala His Thr His Gln		
1105	1110	1115
		1120
His Leu Gln Asp Val Asp Ile Glu Pro Tyr Val Ser Lys Met Leu Gly		
1125	1130	1135
Thr Gly Lys Leu Gly Phe Ser Phe Val Arg Ile Thr Ala Leu Leu Ile		
1140	1145	1150

Ala Gly Asn Arg Leu Trp Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Val Ile Ser

1155

1160

1165

Ile Pro Leu Thr Glu Thr Val Val Leu His Arg Gly Gln Leu Leu Gly

1170

1175

1180

Leu Arg Ala Asn Lys Thr Ser Pro Thr Ser Gly Glu Gly Thr Arg Pro

185

1190

1195

1200

Gly Gly Ile Ile His Val Tyr Gly Asp Asp Ser Ser Asp Lys Ala Ala

1205

1210

1215

Ser Ser Phe Ile Pro Tyr Cys Ser Met Ala Gln Ala Gln Leu Cys Phe

1220

1225

1230

His Gly His Arg Asp Ala Val Lys Phe Phe Val Ser Val Pro Gly Asn

1235

1240

1245

Val Leu Ala Thr Leu Asn Gly Ser Val Leu Asp Ser Pro Ser Glu Gly

1250

1255

1260

Pro Gly Pro Ala Ala Pro Ala Ala Asp Ala Glu Gly Gln Lys Leu Lys

265

1270

1275

1280

Asn Ala Leu Val Leu Ser Gly Gly Glu Gly Tyr Ile Asp Phe Arg Ile

1285

1290

1295

Gln Glu Ile His Glu Lys Val Leu Asn Glu Ala Val Gly Ala Leu Met

50

55

60

Tyr His Thr Ile Thr Leu Thr Arg Glu Asp Leu Glu Lys Phe Lys Ala

65

70

75

80

Leu Arg Ile Ile Val Arg Ile Gly Ser Gly Phe Asp Asn Ile Asp Ile

85

90

95

Lys Ser Ala Gly Asp Leu Gly Ile Ala Val Cys Asn Val Pro Ala Ala

100

105

110

Ser Val Glu Glu Thr Ala Asp Ser Thr Leu Cys His Ile Leu Asn Leu

115

120

125

Tyr Arg Arg Thr Thr Trp Leu His Gln Ala Leu Arg Glu Gly Thr Arg

130

135

140

Val Gln Ser Val Glu Gln Ile Arg Glu Val Ala Ser Gly Ala Ala Arg

145

150

155

160

Ile Arg Gly Glu Thr Leu Gly Ile Ile Gly Leu Gly Arg Val Gly Gln

165

170

175

Ala Val Ala Leu Arg Ala Lys Ala Phe Gly Phe Asn Val Leu Phe Tyr

180

185

190

Asp Pro Tyr Leu Ser Asp Gly Ile Glu Arg Ala Leu Gly Leu Gln Arg
195 200 205

Val Ser Thr Leu Gln Asp Leu Leu Phe His Ser Asp Cys Val Thr Leu
210 215 220

His Cys Gly Leu Asn Glu His Asn His His Leu Ile Asn Asp Phe Thr
225 230 235 240

Val Lys Gln Met Arg Gln Gly Ala Phe Leu Val Asn Thr Ala Arg Gly
245 250 255

Gly Leu Val Asp Glu Lys Ala Val Ala Gln Ala Leu Lys Glu Gly Arg
260 265 270

Ile Arg Gly Ala Ala Leu Asp Val His Glu Ser Glu Pro Phe Ser Phe
275 280 285

Ser Gln Gly Pro Leu Lys Asp Ala Pro Asn Leu Ile Cys Thr Pro His
290 295 300

Ala Ala Trp Tyr Ser Glu Gln Ala Ser Ile Glu Met Arg Glu Glu Ala
305 310 315 320

Ala Arg Glu Ile Arg Arg Ala Ile Thr Gly Arg Ile Pro Asp Ser Leu

<400> 14

Met Met Ala Gly Glu Gly Ser Thr Ile Thr Ser Arg Ile Lys Asn Leu

1 5 10 15

Leu Arg Ser Pro Ser Ile Lys Leu Arg Arg Ser Lys Ala Gly Asn Arg

20 25 30

Arg Glu Asp Leu Ser Ser Lys Val Thr Leu Glu Lys Val Leu Gly Val

35 40 45

Thr Val Ser Gly Gly Arg Gly Leu Ala Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu

50 55 60

Val Ala Tyr Pro Ala Gly Cys Val Val Val Leu Phe Asn Pro Arg Lys

65 70 75 80

His Lys Gln His His Ile Leu Asn Ser Ser Arg Lys Thr Ile Thr Ala

85 90 95

Leu Ala Phe Ser Pro Asp Gly Lys Tyr Leu Val Thr Gly Glu Ser Gly

100 105 110

His Met Pro Ala Val Arg Val Trp Asp Val Ala Glu Arg Ser Gln Val

115 120 125

Ala Glu Leu Gln Glu His Lys Tyr Gly Val Ala Cys Val Ala Phe Ser

130 135 140
Pro Ser Ala Lys Tyr Ile Val Ser Val Gly Tyr Gln His Asp Met Ile
145 150 155 160
Val Asn Val Trp Ala Trp Lys Lys Asn Ile Val Val Ala Ser Asn Lys
165 170 175
Val Ser Ser Arg Val Thr Ala Val Ser Phe Ser Glu Asp Cys Ser Tyr
180 185 190
Phe Val Thr Ala Gly Asn Arg His Ile Lys Phe Trp Tyr Leu Asp Asp
195 200 205
Ser Lys Thr Ser Lys Val Asn Ala Thr Val Pro Leu Leu Gly Arg Ser
210 215 220
Gly Leu Leu Gly Glu Leu Arg Asn Asn Leu Phe Thr Asp Val Ala Cys
225 230 235 240
Gly Arg Gly Glu Lys Ala Asp Ser Thr Phe Cys Ile Thr Ser Ser Gly
245 250 255
Leu Leu Cys Glu Phe Ser Asp Arg Arg Leu Leu Asp Lys Trp Val Glu
260 265 270

Thr Cys Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asn Thr Glu Ser Ser
420 425 430

Gly Val His Gly Ser Thr Leu His Arg Asn Ile Leu Ser Asn Asp Leu
435 440 445

Ile Lys Ile Ile Tyr Val Asp Gly Asn Thr Gln Ala Leu Leu Asp Thr
450 455 460

Glu Leu Pro Gly Gly Asp Lys Ala Asp Gly Ser Leu Met Asp Pro Arg
465 470 475 480

Val Gly Ile Arg Ser Val Cys Ile Ser Pro Asn Gly Gln His Leu Ala
485 490 495

Ser Gly Asp Arg Met Gly Thr Leu Arg Ile His Glu Leu Gln Ser Leu
500 505 510

Ser Glu Met Leu Lys Val Glu Ala His Asp Ser Glu Ile Leu Cys Leu
515 520 525

Glu Tyr Ser Lys Pro Asp Thr Gly Leu Lys Leu Leu Ala Ser Ala Ser
530 535 540

Arg Asp Arg Leu Ile His Glu Leu Asp Ala Gly Arg Glu Tyr Ser Leu

545 550 555 560

Gln Gln Thr Leu Asp Glu His Ser Ser Ser Ile Thr Ala Val Lys Phe

 565 570 575

Ala Ala Ser Asp Gly Gln Val Arg Met Ile Ser Cys Gly Ala Asp Lys

 580 585 590

Ser Ile Tyr Phe Arg Thr Ala Gln Lys Ser Gly Glu Gly Val Gln Phe

 595 600 605

Thr Arg Thr His His Val Val Arg Lys Thr Thr Leu Tyr Asp Met Asp

 610 615 620

Val Glu Pro Ser Trp Lys Tyr Thr Ala Ile Gly Cys Gln Asp Arg Asn

625 630 635 640

Ile Arg Ile Phe Asn Ile Ser Ser Gly Lys Gln Lys Lys Leu Phe Lys

 645 650 655

Gly Ser Gln Gly Glu Asp Gly Thr Leu Ile Lys Val Gln Thr Asp Pro

 660 665 670

Ser Gly Ile Tyr Ile Ala Thr Ser Cys Ser Asp Lys Asn Leu Ser Ile

 675 680 685

Phe Asp Phe Ser Ser Gly Glu Cys Val Ala Thr Met Phe Gly His Ser
690 695 700

Glu Ile Val Thr Gly Met Lys Phe Ser Asn Asp Cys Lys His Leu Ile
705 710 715 720

Ser Val Ser Gly Asp Ser Cys Ile Phe Val Trp Arg Leu Ser Ser Glu
725 730 735

Met Thr Ile Ser Met Arg Gln Arg Leu Arg Glu Arg Arg Gln Arg Gln
740 745 750

Arg Gly Ile Lys Gln Gln Gly Pro Thr Ser Pro Gln Arg Ala Ser Gly
755 760 765

Ala Lys Gln His His Ala Pro Val Val Pro Pro Ser Gly Pro Ala Leu
770 775 780

Ser Ser Asp Ser Asp Lys Glu Gly Glu Asp Glu Gly Thr Glu Glu Glu
785 790 795 800

Glu Leu Pro Ala Leu Pro Ile Leu Ser Lys Ser Thr Lys Lys Glu Leu
805 810 815

Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Leu Leu Arg Ser Leu Ser His Trp Glu
820 825 830

Met Ser Arg Ala Gln Glu Thr Met Glu Tyr Leu Asp Pro Ala Pro Val
835 840 845

Ala Asn Thr Gly Pro Lys Arg Arg Gly Arg Trp Ala Gln Pro Gly Val
850 855 860

Glu Leu Ser Val Arg Ser Met Leu Asp Leu Arg Gln Ile Glu Thr Leu
865 870 875 880

Ala Pro Ser Pro Arg Gly Pro Ser Gln Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro
885 890 895

Ala Gly Pro Gly Lys His Gly Pro Gln Ala Pro Glu Leu Ser Cys Val
900 905 910

Ser Gln Asn Glu Arg Ala Pro Arg Leu Gln Thr Ser Gln Pro Cys Ser
915 920 925

Cys Pro Asp Ile Ile Gln Leu Leu Ser Gln Glu Glu Gly Val Phe Ala
930 935 940

Gln Asp Leu Glu Pro Ala Pro Ile Glu Asp Gly Ile Val Tyr Pro Glu
945 950 955 960

Pro Ser Asp Ser Pro Thr Met Asp Thr Ser Ala Phe Gln Val Gln Ala

965

970

975

Pro Thr Gly Gly Ser Leu Gly Arg Met Tyr Pro Gly Ser Arg Gly Ser

980

985

990

Glu Lys His Ser Pro Asp Ser Ala Cys Ser Val Asp Tyr Ser Ser Ser

995

1000

1005

Arg Leu Ser Ser Pro Glu His Pro Asn Glu Asp Ser Glu Ser Thr Glu

1010

1015

1020

Pro Leu Ser Val Asp Gly Ile Ser Ser Asp Leu Glu Glu Pro Ala Glu

025

1030

1035

1040

Gly Asp Glu Asp Glu Glu Glu Gly Gly Thr Gly Leu Cys Gly Leu

1045

1050

1055

Gln Glu Gly Gly Pro Arg Thr Pro Asp Gln Glu Gln Phe Leu Lys Gln

1060

1065

1070

Leu Phe Glu Thr Leu Ala Asn Gly Thr Ala Pro Gly Gly Pro Ala Arg

1075

1080

1085

Val Leu Glu Arg Thr Glu Ser Arg Ser Ile Ser Ser Arg Phe Leu Leu

1090

1095

1100

Gln Val Gln Thr Leu Pro Leu Arg Glu Pro Ser Leu Ser Ser Ser Gly
105 1110 1115 1120

Leu Ala Leu Thr Ser Arg Pro Asp Gln Val Ser Gln Val Ser Gly Glu
1125 1130 1135

Gln Leu Lys Gly Ser Gly Ala Thr Pro Pro Gly Ala Pro Pro Glu Met
1140 1145 1150

Glu Pro Ser Ser Gly Asn Ser Gly Pro Lys Gln Val Ala Pro Val Leu
1155 1160 1165

Leu Thr Arg Arg Arg Asn Asn Leu Asp Asn Ser Trp Ala Ser Lys Lys
1170 1175 1180

Met Ala Ala Thr Arg Pro Leu Ala Gly Leu Gln Lys Ala Gln Ser Val
185 1190 1195 1200

His Ser Leu Val Pro Gln Asp Glu Val Pro Ser Ser Arg Pro Leu Leu
1205 1210 1215

Phe Arg Glu Ala Glu Thr Gln Gly Ser Leu Gly Ser Leu Pro Gln Ala
1220 1225 1230

Gly Gly Cys Ser Ser Gln Pro His Ser Tyr Gln Asn His Thr Thr Ser
1235 1240 1245

Ser Met Ala Lys Leu Ala Arg Ser Ile Ser Val Gly Glu Asn Pro Gly
1250 1255 1260

Leu Ala Thr Glu Pro Gln Ala Pro Ala Pro Ile Arg Ile Ser Pro Phe
265 1270 1275 1280

Asn Lys Leu Ala Leu Pro Ser Arg Ala His Leu Val Leu Asp Ile Pro
1285 1290 1295

Lys Pro Leu Pro Asp Arg Pro Thr Leu Thr Thr Phe Ser Pro Val Ser
1300 1305 1310

Lys Gly Leu Thr His Asn Glu Thr Glu Gln Ser Gly Pro Leu Arg Glu
1315 1320 1325

Pro Arg Lys Ala His Thr Thr Val Glu Lys His Ser Cys Leu Gly Glu
1330 1335 1340

Gly Thr Thr His Lys Ser Arg Thr Glu Cys Gln Ala Tyr Pro Gly Pro
345 1350 1355 1360

Asn His Pro Cys Arg Gln Gln Leu Pro Val Asn Asn Leu Leu Gln Ala
1365 1370 1375

Glu Ser Leu Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Thr Arg Asn Pro Val Glu

1380

1385

1390

Ser Ser Arg Pro Gly Val Ala Leu Ser Gln Asp Ser Glu Leu Ala Leu

1395

1400

1405

Ser Leu Gln Gln Cys Glu Gln Leu Val Ala Glu Leu Gln Gly Asn Val

1410

1415

1420

Arg Gln Ala Val Glu Leu Tyr Arg Ala Val Thr Ser Cys Lys Thr Pro

425

1430

1435

1440

Ser Ala Glu Gln Ser His Ile Thr Arg Leu Leu Arg Asp Thr Phe Ser

1445

1450

1455

Pro Val Arg Gln Glu Leu Glu Val Leu Ala Gly Ala Val Leu Ser Ser

1460

1465

1470

Pro Gly Gly Ser Pro Gly Ala Val Ala Ala Glu Gln Thr Gln Ala Leu

1475

1480

1485

Leu Glu Gln Tyr Ser Glu Leu Leu Leu Arg Ala Val Glu Arg Arg Met

1490

1495

1500

Glu Arg Arg Leu

505

<210> 15

<211> 244

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 15

Ser Ser Lys Tyr Ser Asn Glu Ser Arg Ser Gln Ala Asp Ser Gly Phe

1

5

10

15

Leu Gly Leu Arg Pro Thr Ser Val Asp Pro Ala Leu Arg Arg Arg Arg

20

25

30

Arg Gly Pro Arg Asn Lys Lys Arg Gly Trp Arg Arg Leu Ala Glu Glu

35

40

45

Pro Leu Gly Leu Glu Val Asp Gln Phe Leu Glu Asp Val Arg Leu Gln

50

55

60

Glu Arg Thr Thr Gly Gly Leu Leu Ala Glu Ala Pro Asn Glu Lys Leu

65

70

75

80

Phe Phe Val Asp Thr Gly Phe Lys Arg Lys Glu Pro Arg Lys Lys Arg

85

90

95

Thr Leu Val Gln Lys Lys Ser Gln Arg Leu Gln Lys Pro Leu Arg Val

100 105 110
Asp Leu Ala Leu Glu Asn His Ser Lys Ile Pro Ala Pro Lys Asp Ile
115 120 125
Leu Ala His Gln Val Pro Asn Ala Lys Lys Leu Arg Arg Lys Glu Glu
130 135 140
Leu Trp Glu Lys Leu Ala Lys Gln Gly Glu Leu Pro Arg Asp Val Arg
145 150 155 160
Lys Ala Gln Ala Arg Leu Leu Ser Pro Pro Thr Pro Lys Ala Lys Pro
165 170 175
Gly Pro Gln Asp Ile Ile Glu Arg Pro Phe Tyr Asp Leu Trp Asn Pro
180 185 190
Asp Asn Pro Leu Asp Thr Pro Leu Ile Gly Gln Asp Ala Phe Phe Leu
195 200 205
Glu Gln Thr Lys Lys Lys Gly Val Arg Arg Pro Gln Arg Leu His Ile
210 215 220
Lys Pro Ser Gln Val Pro Ala Val Glu Val Ile Pro Ala Gly Ala Ser
225 230 235 240

Tyr Asn Pro Thr

<210> 16

<211> 484

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 16

Met Ala Ala Gly Gly Asn Arg Asp Gly Glu Lys Arg Gly Ser Arg Ser
 1 5 10 15

Gln Ala Asp Ser Gly Phe Leu Gly Leu Arg Pro Thr Ser Val Asp Pro
 20 25 30

Ala Leu Arg Arg Arg Arg Arg Gly Pro Arg Asn Lys Lys Arg Gly Trp
 35 40 45

Arg Arg Leu Ala Glu Glu Pro Leu Gly Leu Glu Val Asp Gln Phe Leu
 50 55 60

Glu Asp Val Arg Leu Gln Glu Arg Thr Thr Gly Gly Leu Leu Ala Glu
 65 70 75 80

Ala Pro Asn Glu Lys Leu Phe Phe Val Asp Thr Gly Phe Lys Arg Lys
 85 90 95

Glu Pro Arg Lys Lys Arg Thr Leu Val Gln Lys Lys Ser Gln Arg Leu
 100 105 110

Gln Lys Pro Leu Arg Val Asp Leu Ala Leu Glu Asn His Ser Lys Ile
 115 120 125

Pro Ala Pro Lys Asp Ile Leu Ala His Gln Val Pro Asn Ala Lys Lys

340 345 350
Ala Ala Arg Lys Leu Arg Val Gln Gln Ala Ala Leu Arg Ala Ala Arg
355 360 365
Leu Gln His Gln Glu Leu Phe Arg Leu Arg Gly Ile Lys Ala Gln Val
370 375 380
Ala Arg Arg Leu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Arg Glu Gln Arg Arg Ile
385 390 395 400
Arg Arg Leu Ala Glu Ala Asp Lys Pro Arg Arg Leu Gly Arg Leu Lys
405 410 415
Tyr Gln Ala Pro Asp Ile Asp Val Gln Leu Ser Ser Glu Leu Ser Gly
420 425 430
Ser Leu Arg Thr Leu Lys Pro Glu Gly His Ile Leu Arg Asp Arg Phe
435 440 445
Lys Ser Phe Gln Lys Arg Asn Met Ile Glu Pro Arg Glu Arg Ala Lys
450 455 460
Phe Lys Arg Lys Tyr Lys Val Lys Leu Val Glu Lys Arg Ala Tyr Arg
465 470 475 480
Glu Ile Gln Leu

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 17

tagatatcgc cttggaacaa gagaaga

27

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 18

atgaattctc agttgttctt tgtgacactg a

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06487

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, A61P 25/28, A61P 25/18, A61P 25/08, A61P 37/00, C12N 15/63 // C12N 1/21, C12R 1:19), (C12P 21/02, C12R 1:19), (C12N 15/12, C12R 1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/00-90, C12N 1/00-5/28, C12P 21/00-08, C12Q 1/00-70, C07K 14/00-16/46, G01N 33/50-98, A61P 1/00-15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PY	Ito M. et al., "JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway", Mol. Cell Biol. (1999 Nov.), Vol. 19, No. 11, p. 7539-7548	1-13, 29, 30, 36 1-39
TX TY	Kelkar N. et al., "Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3", Mol. Cell Biol. (2000 Feb.), Vol. 20, No. 3, p. 1030-1043	1-13, 29, 30, 36 1-39
X Y	Maria de Fatima Bonaldo et al., "Normalization and subtraction: Two approaches to facilitate gene discovery", Genome Research (1996), Vol. 6, No. 9, p. 791-806	13 14
X Y	Schaeper U. et al., "Molecular cloning and characterization of cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation",	13 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report
07 March, 2000 (07.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06487

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995 Nov.), Vol.92, No.23 , p.10467-10471	
PX PY	Yoshioka K. et al., "A novel Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein that enhances the activation of JNK by MEK kinase 1 and TGF-beta-activated", FEBS Lett. (1999 Sep.) , Vol.457 , No.3 , p.385-388	1,2,29,30 1-39
A	JP, 10-57074, A (Kirin Brewery Company, Limited.), 03 March, 1998 (03.03.98) (Family: none)	21-27,37-39

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06487

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K 14/47, C12N 15/12, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, C12P 21/08, G01N 33/53, A61P 25/28, A61P 25/18, A61P 25/08, A61P 37/00, C12N 15/63 // (C12N 1/21, C12R 1:19), (C12P 21/02, C12R 1:19), (C12N 15/12, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/00~90, C12N 1/00~5/28, C12P 21/00~08, C12Q 1/00~70, C07K 14/00~16/46, G01N 33/50~98, A61P 1/00~15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{PX}{PY}$	Ito M. et al., "JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway", Mol. Cell Biol. (1999 Nov.), Vol. 19, No. 11, p. 7539-7548	$\frac{1-13, 29, 30, 36}{1-39}$
$\frac{TX}{TY}$	Kelkar N. et al., "Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3", Mol. Cell Biol. (2000 Feb.), Vol. 20, No. 3, p. 1030-1043	$\frac{1-13, 29, 30, 36}{1-39}$

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 02. 00

国際調査報告の発送日

07.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

印

4 B 8 9 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$	Maria de Fatima Bonaldo et al., "Normalization and subtraction: Two approaches to facilitate gene discovery", Genome Research (1996), Vol.6, No.9 p.791-806	$\frac{1\ 3}{1\ 4}$
$\frac{X}{Y}$	Schaeper U. et al., "Molecular cloning and characterization of cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995 Nov.), Vol.92, No.23, p.10467-10471	$\frac{1\ 3}{1\ 4}$
$\frac{P\ X}{P\ Y}$	Yoshioka K. et al., "A novel Jun N-terminal kinase (JNK)- binding protein that enhances the activation of JNK by MEK kinase 1 and TGF-beta-activated", FEBS Lett. (1999 Sep.), Vol.457, No.3, p.385-388	$\frac{1, 2, 29, 30}{1-39}$
A	JP, 10-57074, A (麒麟麦酒株式会社) 3.3月.1998 (03.03.98) ファミリーなし	21-27, 37-39

30. 請求項1または2記載のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

31. 請求項1または2記載のポリペプチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

32. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

33. 請求項13または14記載のオリゴヌクレオチドを含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

34. 請求項17記載の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の予防薬。

35. 請求項17記載の抗体を含有する、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症等の神経変性疾患、筋萎縮性側索硬化症等の筋萎縮性疾患、虚血性疾患、脳卒中時の脳障害、精神分裂病、うつ病、てんかん、各種免疫、炎症性疾患の治療薬。

36. 請求項1または2記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

37. 請求項36記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

38. レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から選ばれる遺伝子である、請求項37記載のスクリーニング方法。

39. 請求項37または38記載の方法により得られる化合物またはその薬理学的に許容される塩。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.